

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Analytická chemie



Bc. Monika Hubáčková

VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ NIMESULIDU POMOCÍ GRAFITOVÉ KOMPOZITNÍ ELEKTRODY

Voltammetric Determination of Nimesulide Using Graphite Composite Electrode

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Vlastimil Vyskočil, Ph.D.

Praha 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část, nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 18. ledna 2022.

Poděkování

Chtěla bych poděkovat prof. RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, ochotu a cenné rady. Dále děkuji za trpělivost, pochopení a vstřícnost při konzultacích. Chtěla bych také poděkovat své rodině, manželovi a rodičům, kteří mě podporovali celé studium.

Abstrakt

Diplomová práce se zabývá studiem elektrochemického chování nesteroidního protizánětlivého léčiva nimesulidu. Cílem této práce je nalezení optimálních podmínek stanovení nimesulidu pomocí voltametrických technik DC voltametrie (DCV) a diferenční pulzní voltametrie (DPV) v oxidačních i redukčních oblastech potenciálů. Jako pracovní elektroda byla použita kompozitní elektroda z ultračistého grafitu (UTGE). Pro výběr optimálního pH byla proměřena pH závislost, určen pravděpodobný mechanismus reakcí, dále byla prověřena opakovatelnost měření, a nakonec byly proměřeny a vyhodnoceny kalibrační závislosti ve vybraných prostředích.

Pro měření kalibračních křivek v koncentračním rozmezí 0,1–100 $\mu\text{mol l}^{-1}$ byla vybrána prostředí BR pufru o pH 2 a 4 pro DCV a pH 2 a 5 pro DPV. Meze detekce pro DCV i DPV na UTGE se pohybovali v řádech $10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$, což jsou hodnoty odpovídající alternativním voltametrickým metodám, které rovněž využívají nemodifikovaných pracovních elektrod.

Abstract

This Diploma Thesis deals with the study of the electrochemical behaviour of the nonsteroidal anti-inflammatory drug nimesulide. The aim of this work is to find optimal conditions for the determination of nimesulide using voltammetric techniques direct current voltammetry (DCV) and differential pulse voltammetry (DPV) in oxidation and reduction potential regions. An ultra-trace graphite electrode (UTGE) was used as the working electrode. The pH dependence was measured to select the optimal pH, the probable mechanism of reactions was determined, the repeatability of the measurements was checked, and finally the calibration dependences were constructed and evaluated in the selected media.

BR buffer media of pH 2 and 4 for DCV and pH 2 and 5 for DPV were selected to measure calibration curves in the concentration range of 0.1–100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. The detection limits for both methods DCV and DPV at the UTGE were in order of about $10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, which are values corresponding to alternative voltammetric methods that also use unmodified working electrodes.

Klíčová slova

Elektrochemie

Netradiční elektrodové materiály

Grafitová kompozitní elektroda

DC voltametrie

Diferenční pulzní voltametrie

Nimesulid

Key words

Electrochemistry

Non-traditional electrode materials

Graphite composite electrode

DC voltammetry

Differential pulse voltammetry

Nimesulide

Seznam použitých zkratk

BR pufr	Brittonův-Robinsonův pufr
CFE	uhlíková filmová elektroda
CNT	uhlíkové nanotrubičky
COX	cyklooxygenasa
CPE	uhlíková pastová elektroda
CV	cyklická voltametrie
DCV	DC voltametrie
DPV	diferenční pulzní voltametrie
GCE	elektroda ze skelného uhlíku
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda
I_p	proud píku látky
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
NIM	nimesulid
NSAID	nesteroidní protizánětlivé léčivo
s_r	relativní směrodatná odchylka
SWV	square-wave voltametrie
UTGE	kompozitní elektroda z ultračistého grafitu

Obsah

1. Úvod	9
2. Teoretická část	10
2.1 Vlastnosti a struktura NIM	10
2.2 Mechanismy působení NIM.....	11
2.3 Analytické techniky stanovení NIM	13
2.4 Elektrochemické metody stanovení NIM	13
2.4.1 Nemodifikované elektrody	13
2.4.2 Modifikované uhlíkové elektrody	15
2.4.3 Zlatá elektroda	21
2.5 Pracovní elektroda	22
3. Experimentální část	24
3.1 Použité chemikálie	24
3.2 Přístroje a zařízení	24
3.3 Pracovní postupy.....	24
4. Výsledky a diskuze.....	26
4.1 Nalezení optimálního pH	26
4.1.1 Oxidační stanovení NIM	26
4.1.2 Redukční stanovení NIM.....	32
4.2 Opakovatelnost měření	37
4.3 Kalibrační závislosti	40

4.3.1	Oxidační stanovení NIM	40
4.3.2	Redukční stanovení	45
5.	Závěr.....	54
6.	Literatura	56

1. Úvod

Techniky pro detekci a stanovení nesteroidního protizánětlivého léčiva nimesulidu (NIM), které účinně brání bolesti a snižuje horečku, zahrnují techniky chromatografické, elektrochemické a spektrometrické. Chromatografie a spektrometrie však vyžadují několik časově náročných manipulačních kroků a relativně drahé přístroje. Elektrochemické metody jsou široce používány jako rychlé, jednoduché a přesné metody.

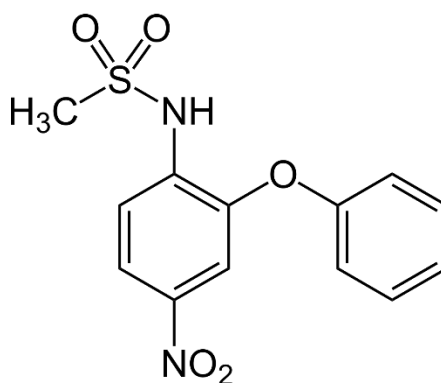
Stanovení léčiv je v dnešní době čím dál cílenější téma z hlediska lékařského i environmentálního. Cílem této práce je nalézt vhodné podmínky pro stanovení nesteroidního protizánětlivého léčiva NIM, dobrou stabilitu, opakovatelnost a reprodukovatelnost stanovení. Pro stanovení jsou použity techniky DC voltametrie (DCV) a diferenční pulzní voltametrie (DPV) na kompozitní elektrodě z ultračistého grafitu (UTGE). Práce se snaží dosáhnout co nejnižších meze detekce (LOD) a stanovitelnosti (LOQ) na této chemicky nemodifikované pracovní elektrodě. Měření probíhá v prostředí Brittonova-Robinsonova roztoku v tříelektrodevém zapojení.

2. Teoretická část

2.1 Vlastnosti a struktura NIM

NIM je nažloutlý krystalický prášek, který je rozpustný v acetonu, chloroformu a ethylacetátu, slabě rozpustný v ethanolu a prakticky nerozpustný ve vodných systémech, což vede k obtížím ve farmaceutické formulaci orálních nebo injekčních roztoků a k proměnlivé biologické dostupnosti. Byly provedeny studie ke zvýšení rozpustnosti NIM ve vodě jeho začleněním do komplexu NIM–L-lysin– β -cyklodextrin, ale žaludeční bezpečnost NIM závisí na koncentraci léčiva dosažené v žaludeční sliznici. Zvýšená rozpustnost léčiva z komplexu β -cyklodextrinu by tedy mohla mít za následek zvýšené podráždění žaludku v důsledku zvýšené místní koncentrace léčiva [1].

NIM je nesteroidní protizánětlivé léčivo (NSAID), účinně brání bolesti a snižuje horečku. Používá se pro léčbu akutní bolesti a primární dysmenorey u dospívajících a dospělých starších 12 let. Přípravky se používaly i k symptomatické léčbě osteoartrózy, avšak kvůli gastrointestinálním a hepatickým nežádoucím účinkům, které by se mohly projevit při nutném dlouhodobějším podávání těchto léčiv při chronickém stavu, bylo jejich užití k léčbě osteoartrózy zakázáno [2]. Na rozdíl od jiných NSAID chemická struktura NIM (obr. 1) neobsahuje karboxylovou skupinu, ale sulfonanilidovou skupinu jako kyselou skupinu [3].



Obrázek 1: Struktura NIM.

U dětí mladších 12 let jsou přípravky s obsahem NIM kontraindikovány, avšak zdá se, že užívání kratší dobu než 10 dní nezvyšuje u dětí riziko podchlazení, gastrointestinálního krvácení, epigastrické bolesti, zvracení, průjmu nebo přechodného, asymptomatického zvýšení jaterních enzymů ve srovnání s ketoprofenem, paracetamolem, kyselinou mefenamovou, aspirinem nebo ibuprofenem [4]. U těhotných a kojících žen je NIM kontraindikován.

Hodnota pK_a NIM 6,5 je velmi důležitá pro žaludeční snášenlivost, protože zabraňuje zpětné difúzi vodíkových iontů odpovědných za poškození tkáně [5]. NIM je obecně dobře snášen, ale vedlejší účinky mohou zahrnovat bolest hlavy, závratě, ospalost, gastrointestinální potíže, nevolnost, břišní potíže, průjem, periferní edém a přecitlivělé reakce. Obecně se nedoporučuje používat při chronických obtížích a u dospělých ne déle než 15 dní [6]. Při chronické léčbě protizánětlivými léky se selektivním inhibitorem cyklooxygenasy COX-2 může existovat zvýšené riziko kardiovaskulárních onemocnění v důsledku nerovnováhy generované vazodilatačním prostacyklinem a vazokonstrikčním tromboxanem – vazokonstriktorem a antiagregantem krevních destiček [7]. NIM je k dispozici na lékařský předpis ve formě kapslí nebo granulí pro perorální suspenzi 100 mg a jako čípky 200 mg v generických i obchodních formulacích [6].

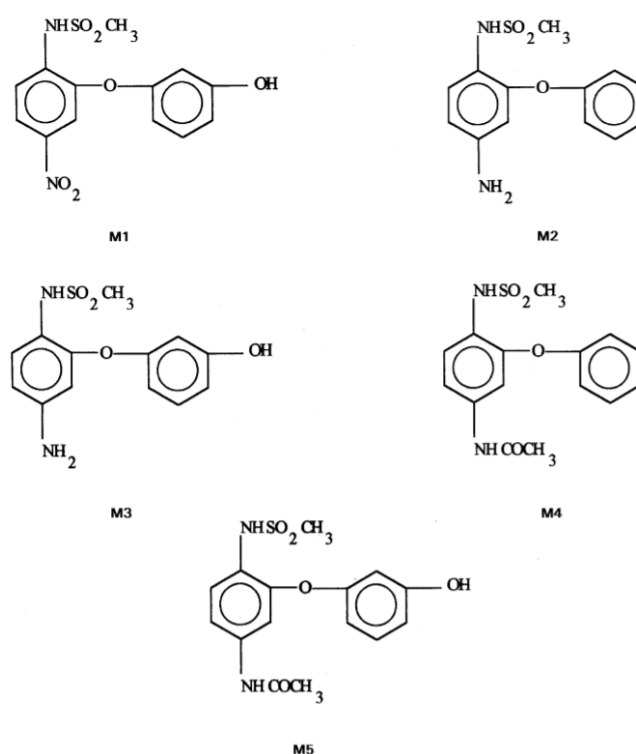
Nejdiskutovanějším negativem NIM je míra jeho hepatotoxicity. NSAID obecně patří mezi nejčastěji používané látky způsobující hepatotoxicitu, avšak přehled hepatotoxicity NSAID uvádí, že bylo hlášeno mnoho případů právě u NIM [8]. Většina případů akutního selhání jater v důsledku působení NIM byla u žen středního věku s nástupem do 2 týdnů až 3 měsíců od zahájení léčby. Příčinou masivní jaterní nekrózy je v tomto případě hepatitida vyvolaná užitím tohoto léčiva [9]. Jaterní sekundární účinky NIM souvisejí s jeho mitochondriální rozpojovací schopností. Nedávné práce naznačují, že tato mitochondriální toxicita závisí na interakci NIM s NAD(P)H [10]. Předpokládá se, že redukovaná forma nitroskupiny NIM je zodpovědná za hepatotoxicitu. Redoxní přeměna NIM by mohla zahrnovat tvorbu hydroxylaminových derivátů nebo generování radikálových derivátů, jako jsou nitroradikálové anionty [11]. Kvůli akutnímu poškození jater je v některých státech distribuce NIM zakázána. Mezi takové státy patří například USA [8].

2.2 Mechanismy působení NIM

NIM působí prostřednictvím řady mechanismů, včetně selektivní inhibice syntézy prostaglandinů, redukce generace superoxidových aniontů z polymorfonukleárních leukocytů, inhibice syntézy agregačního faktoru destiček a zachycování kyseliny chlorné [12].

NIM je téměř úplně biotransformován na 4-hydroxynimesulid ve volných a konjugovaných formách, který zajišťuje podporu protizánětlivé aktivity NIM [13]. NIM je široce metabolizován (1 až 3 % dávky NIM se vylučuje v nezměněné formě močí) na několik

metabolitů, které se vylučují hlavně močí (70 %) a močovými sedimenty (20 %) [12]. Byly charakterizovány a kvantitativně určeny hlavní metabolity NIM v moči člověka po jednorázovém orálním podání 200 mg. Bylo zjištěno, že vznikají hydroxylací fenoxylového jádra (M1), redukcí nitroskupiny na aminoderivát (M2), souběžnou hydroxylací a redukcí (M3) a *N*-acetylací metabolitů M2 (za vzniku M4) a M3 (za vzniku M5) (obr. 2) [1].



Obrázek 2: Močové metabolity NIM. Převzato z [1].

NIM inhibuje enzym cyklooxygenasu (COX), čímž blokuje tvorbu prostaglandinů, které mají důležitou funkci při bolestech. Většina NSAID inhibuje formu COX-1, avšak právě NIM má relativní specifitu pro aktivitu COX-2, která je s bolestmi více spjata. NIM má ale relativně malý účinek na funkci krevních destiček, což je spojeno s aktivitou COX-1 [6]. Díky schopnosti inhibovat COX-2 má také mírnější účinky na gastrointestinální sliznici. Počáteční obecná klinická zkušenost se selektivními inhibitory COX-2 ukazuje, že jsou zvláště slibné u osob s rizikem onemocnění ledvin, hypertenze nebo městnavého srdečního selhání. Selektivní inhibitory COX-2 by tedy měly mít protizánětlivé účinky bez vedlejších účinků na ledviny a žaludek, účinek NIM je přitom srovnatelný nebo lepší než u jiných NSAID [1].

2.3 Analytické techniky stanovení NIM

Pro stanovení obsahu NIM doporučuje Český lékopis potenciometrickou titraci ve směsi voda–aceton, kdy se 0,240 g rozpustí ve 30 ml acetonu, přidá se 20 ml vody a titruje se za použití 0,1 mol l⁻¹ hydroxidu sodného jako titračního činidla. Dále pro stanovení totožnosti je uvedena metoda infračervené absorpční spektrometrie, kde se porovnávají s chemickou referenční látkou (*nimesulidum*) tablety s obsahem nimesulidu. Pokud se spektra liší, rozpustí se odděleně zkoušená látka i referenční látka v acetonu, odpaří se a se zbytky se zaznamenají nová spektra. [14].

K analýze NIM byly například použity techniky (orientační limity detekce v řádech jsou uvedeny v závorce) spektrofotometrické (10⁻⁶ mol l⁻¹), fluorimetrické (10⁻⁸ mol l⁻¹), chromatografické (HPLC, TLC a GC) (10⁻⁸ mol l⁻¹, 10⁻⁷ mol l⁻¹, 10⁻⁶ mol l⁻¹), elektroforetické (CE, CZE a MEKC) (10⁻⁵ mol l⁻¹, 10⁻⁷ mol l⁻¹), voltametrické (až 10⁻⁹ mol l⁻¹) a další. Nejčastěji používanými metodami jsou HPLC a spektrometrické metody [15]. Tyto metody ale potřebují mnohdy značnou předúpravu vzorku (například centrifugaci) a bývají časově náročné, proto je výhodný vývoj nových elektrochemických metod, které tyto předúpravy zpravidla nevyžadují.

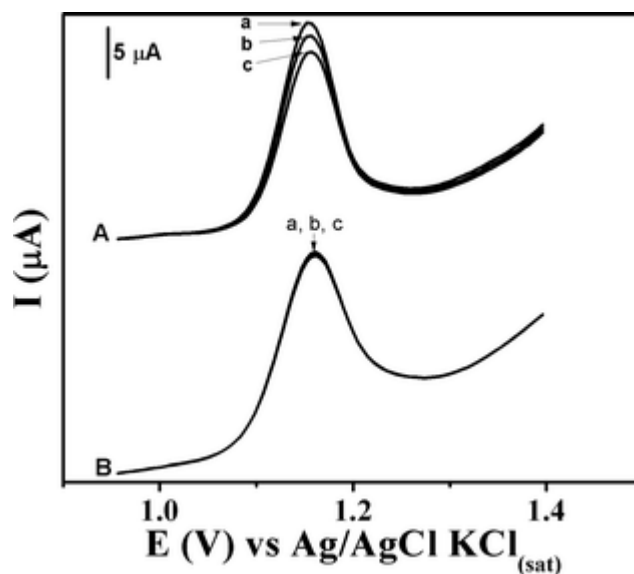
2.4 Elektrochemické metody stanovení NIM

Stanovení obsahu NIM bylo v posledních letech provedeno i řadou elektrochemických technik, jak o tom svědčí níže uvedené elektrochemické metody.

2.4.1 Nemodifikované elektrody

Pevné elektrody. Účinky pasivace na povrch nemodifikovaných pevných elektrod jsou kritické, nejvíce při práci v anodické oblasti potenciálů, proto se studie [16] zaměřuje nejen na popis stanovení NIM, ale i na procesy elektrochemického čištění nemodifikovaných elektrod. Elektrody byly před použitím upraveny následujícími postupy: elektroda ze skelného uhlíku (GCE) byla vyleštěna suspenzí oxidu hlinitého (velikost částic 1,0 a 0,05 μm), povrch elektrody z pyrolytického grafitu byl obnoven pomocí smirkového papíru (zrnitost 2000 mesh). Po procesu leštění byly elektrody vystaveny ultrazvuku po dobu 2 min, opláchnuty deionizovanou vodou a vysušeny pod proudem dusíku. Pro demonstraci regenerace povrchu elektrody byly provedeny dvě série DPV experimentů (obr. 3), jeden (A) měřený bez předběžné úpravy elektrody a druhý (B) s aplikací potenciálu 1,6 V po dobu

10 s před začátkem dalšího stanovení. Když se experimenty opakovaly bez kroku předběžné elektrochemické úpravy, byl pozorován pokles signálu o přibližně 7,2 % na GCE a 16,6 % na elektrodě z pyrolytického grafitu. Opakovatelný signál byl získán, když byla aplikována elektrochemická předúprava, čímž se zabránilo pasivaci elektrody (obr. 3). Rozsah linearity byl určen na GCE od $4,3 \cdot 10^{-5}$ do $4,2 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹, s detekčním limitem $3,2 \cdot 10^{-6}$ mol l⁻¹. Metoda byla aplikována na farmaceutických vzorcích [16].



Obrázek 3: Diferenční pulzní voltamogramy s použitím elektrody z pyrolytického grafitu: (A) elektroda bez jakéhokoli předběžného ošetření před experimentem; (B) elektroda předem kondicionovaná při 1,6 V po dobu 10 s před každým DPV. Záznamy (a), (b) a (c) představují tři po sobě jdoucí měření ve stejném roztoku. Základní elektrolyt: 0,1 mol l⁻¹ H₂SO₄; koncentrace NIM: $1,0 \cdot 10^{-5}$ mol l⁻¹. Převzato z [16].

Borem dopovaná diamantová elektroda. Postup pro současné stanovení NIM a paracetamolu (acetaminofenu) byl proveden vsádkovou injekční analýzou s multipulzní ampérometrickou detekcí. NIM lze elektrochemicky redukovat i oxidovat. Nitroskupina může být redukována na hydroxylaminový derivát, který může být oxidován (kvazi-reverzibilní chování) na nitrosoderivát ve zpětném skenu při pozitivnějších potenciálech. Dále lze pozorovat redukci elektrochemicky generované nitrososloučeniny při druhém dopředném skenu z pozitivních do negativních potenciálů (reverzibilní chování nitrososkupiny). Anodický signál NIM (detekovaný bez předchozí redukce) lze připsat oxidaci methylsulfonamidové skupiny. Jako pracovní elektroda byla použita borem dopovaná diamantová elektroda s výsledným limitem detekce 0,30 mg l⁻¹ ($1,0 \cdot 10^{-6}$ mol l⁻¹) [17].

Rtuťové elektrody. Pomocí adsorpční rozpouštěcí voltametrie byla popsána robustní metoda s lineárním rozsahem $3,32 \cdot 10^{-9}$ – $3,85 \cdot 10^{-7}$ mol l⁻¹ a průměrná výtěžnost lékové

formy byla 101,3 % s s_r 1,3 % ($n = 9$). Užitá byla visící kapková rtuťová pracovní elektroda (HMDE), Ag/AgCl jako referentní elektroda a platinový drát jako pomocná elektroda. Jako optimální základní elektrolyt byl vybrán 0,01 mol l⁻¹ octan amonný, kterém bylo dosaženo s nejvyšší výšky píku. Byl získán dobře definovaný signál s potenciálem přibližně -320 mV. Metoda byla testována na léčivých formách NIM, konkrétně na Aulinu 100 mg [5].

NIM byl stanoven také pomocí square-wave voltametrie (SWV) kombinované s HMDE. Mechanismus elektrodové reakce byl popsán jako jednoelektronová redukce nitroskupiny na stabilní radikálový aniont, po které následoval přenos jednoho elektronu a protonační krok s následnou tvorbou nitrosoanionu. Lineární rozsah metody pro NIM byl 4,98·10⁻⁸–5,66·10⁻⁷ mol l⁻¹, mez detekce byla 4·10⁻⁹ mol l⁻¹ (1,2 µg l⁻¹) a mez stanovitelnosti 1,3·10⁻⁸ mol l⁻¹ (4,2 µg l⁻¹). Metoda byla aplikována na farmaceutických přípravcích v podobě tablet a orálního roztoku s výtěžností 96,23 % ($s_r = 0,7$ %), respektive 89,5 % ($s_r = 4,9$ %) [18].

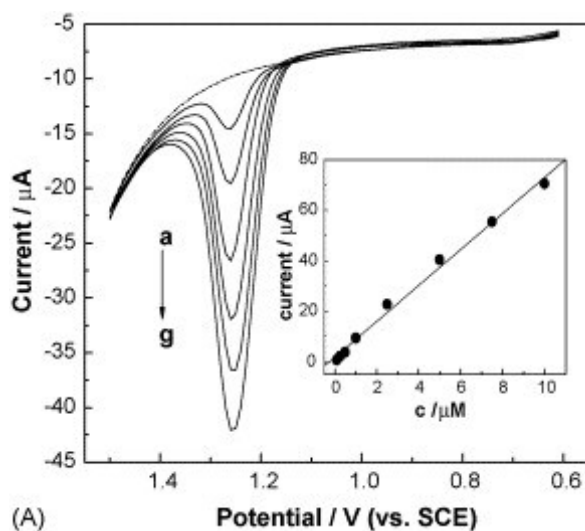
Voltametrickou metodu pro přímou kvantifikaci NIM ve vodných vzorcích navrhla studie na HMDE. Linearita byla vyhodnocena pomocí metody standardních přidavků v rozmezí koncentrací 0,5–130 µg l⁻¹ (1,6–420 nmol l⁻¹) NIM a limit detekce a kvantifikace byl 0,15 µg l⁻¹ (0,49 nmol l⁻¹), respektive 0,50 µg l⁻¹ (1,6 nmol l⁻¹). NIM byl detekován ve vzorcích odpadních vod v koncentracích od 101,7 do 385,0 µg l⁻¹ (0,33–1,25 µmol l⁻¹). Cyklická voltametrie a diferenční pulzní adsorpční katodická voltametrie byly voltametrické metody použité v této studii. Cyklický voltamogram vykazuje pouze jeden nevratný pík při redukčním potenciálu -0,65 ± 0,02 V, tento pík odpovídá redukci nitroskupiny v NIM v důsledku přenosu čtyř elektronů a čtyř protonů mezi povrchem pracovní elektrody a studovaným analytem [19].

Diferenční pulsní polarografií na kapající rtuťové elektrodě jako pracovní elektrodě v 0,1M roztoku NaOH jako základním elektrolytu bylo zjištěno, že rozsah linearit pro NIM je 5,18·10⁻⁶ až 4,67·10⁻⁵ mol l⁻¹, s limitem detekce 5,02·10⁻⁶ mol l⁻¹ a limitem kvantifikace 1,67·10⁻⁵ mol l⁻¹ [20].

2.4.2 Modifikované uhlíkové elektrody

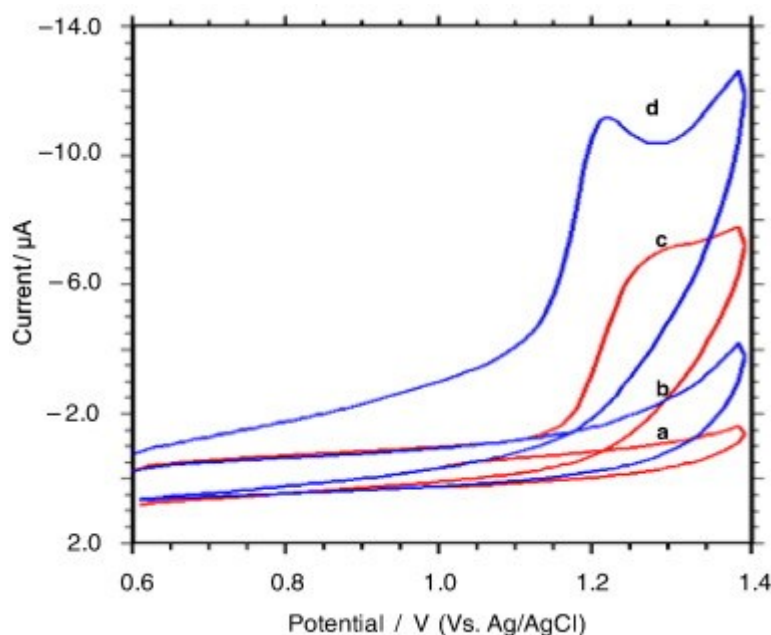
Elektroda ze skelného uhlíku (GCE). Pro stanovení NIM v lidském séru byly použity uhlíkové nanotrubičky (CNT) s kyselinou cysteovou, která byla připravena elektrochemickou oxidací l-cysteinu, k vytvoření nového kompozitního tenkého filmového materiálu na GCE. Modifikovaná GCE byla použita jako pracovní elektroda, pomocnou

elektrodou byl platinový drátek a referenční elektrodou byla nasycená kalomelová elektroda. Stanovení NIM na kompozitní chemicky modifikované elektrodě se silnou akumulací NIM bylo studováno pomocí DPV. Byl získán dobře vyvinutý anodický oxidační pík při 1,25 V (obr. 4). Proud byl lineárně závislý na koncentraci NIM v rozmezí $1,0 \cdot 10^{-7}$ – $1,0 \cdot 10^{-5}$ mol l⁻¹ v 0,05 mol l⁻¹ roztoku H₂SO₄ s korelačním koeficientem 0,997. Bylo zjištěno, že mez detekce ($S/N = 3$) je $5,0 \cdot 10^{-8}$ mol l⁻¹. Cenově výhodná modifikovaná elektroda vykazovala dobrou citlivost, selektivitu, stabilitu a byla použita pro stanovení NIM ve farmaceutických přípravcích a vzorcích lidského séra [21].



Obrázek 4: DPV různých koncentrací NIM v 0,05 mol l⁻¹ H₂SO₄. (a) Blank: přerušovaná čára, (b)–(g) jsou koncentrace NIM: $4,0 \cdot 10^{-7}$, $1,0 \cdot 10^{-6}$, $2,0 \cdot 10^{-6}$, $2,7 \cdot 10^{-6}$, $3,4 \cdot 10^{-6}$ a $4,0 \cdot 10^{-6}$ mol l⁻¹. Pracovní elektroda: kyselina cysteová/CNT/GCE; akumulací potenciál za míchání: 0,0 V; doba akumulace: 120 s; klidový čas: 30 s; rychlost skenu: $0,010$ V s⁻¹; výška pulzu: 0,050 V; šířka pulzu: 0,05 s; pulzní perioda: 0,2 s; citlivost: $1,0 \cdot 10^{-5}$ A V⁻¹. Vložená je odpovídající kalibrační závislost NIM. Převzato z [21].

Další účinnou možností pro stanovení NIM byla úprava povrchu GCE pomocí nanočástic TiO₂ (Obr. 5). Při anodické DPV byl pozorován široký lineární rozsah 0,1–40 µmol l⁻¹ s limity detekce a kvantifikace 3,37 nmol l⁻¹ a 11,2 nmol l⁻¹. Dále bylo pozorováno, že do reakčního mechanismu byly zapojeny dva protony a dva elektrony s nevratným a difúzí řízeným elektrodovým procesem při pH 2. Byla zde použita metoda cyklické voltametrie a DPV [22].



Obrázek 5: Elektrochemické chování 1,0 mM NIM zaznamenané pomocí cyklické voltametrie. Doba akumulace NIM: 20 s; rychlost skenování: 100 mV s⁻¹; (a) nemodifikovaná GCE a roztok fosfátového pufru o pH 2; (b) TiO₂ nanočásticemi modifikovaná GCE a roztok fosfátového pufru o pH 2; (c) nemodifikovaná GCE a 1,0 mM NIM ve fosfátovém pufru o pH 2; (d) TiO₂ nanočásticemi modifikovaná GCE a 1,0 mM NIM ve fosfátovém pufru o pH 2. Převzato z [22].

Metoda pro současné stanovení antibiotika amoxicilin a NIM, široce používaných v kombinaci, byla realizována pomocí elektrochemického senzoru, který používá substrát ze skelného uhlíku modifikovaný sazemi imobilizovanými v dihexadecylfosfátovém filmu. Byla použita metoda SWV, kterou byl získán detekční limit pro NIM 0,016 µmol l⁻¹. Tato nová elektroanalytická metoda byla úspěšně aplikována při simultánním stanovení amoxicilinu a NIM v biologických vzorcích moči a životního prostředí. Pro NIM byly výtěžky ve vzorku moči 91 %, v jezerní vodě 92 % a ve vodě z vodovodu 98 % [23].

Pro individuální a současné stanovení NIM a piroxikamu byla vyvinuta GCE modifikovaná redukováním oxidem grafenu a poly(3,4-ethylendioxythiofenu)-poly(styrenulfonátem). Elektrochemické chování elektrody bylo zkoumáno pomocí cyklické voltametrie a SWV, které poskytly analyticky využitelné křivky v rozsahu koncentrací 8,0·10⁻⁸–1,9·10⁻⁶ mol l⁻¹ pro NIM, s detekčním limitem 2,4·10⁻⁹ mol l⁻¹. Absence redukčních píků během skenování katodového potenciálu ukázala, že analyty podstoupily nevratné oxidační reakce. Vyvinutá metoda byla úspěšně použita k analýze vzorků říční vody a farmaceutických produktů s průměrnými výtěžnostmi blízkými 100 % [24].

Pro zkoumání elektrochemického chování NIM byla také použita GCE modifikovaná nanočásticemi 5% baryem dopovaného oxidu zinečnatého. Byla navržena DPV metoda pro stanovení NIM v lineárním rozsahu 1,0·10⁻⁷ až 1,0·10⁻⁵ mol l⁻¹, s limitem detekce 1,8 nmol l⁻¹

a limitem kvantifikace $5,9 \text{ nmol l}^{-1}$. Metoda byla aplikována na léčivo v tabletách s výtěžností 95,3–102,4 % s s_r 2,7 % a na vzorky moči s výtěžností 97,1–100,6 % s s_r 1,3 % [25].

GCE byla také modifikována nanočásticemi karbidu křemíku a použita ke zkoumání NIM pomocí voltametrie a chronoampérometrie. NIM podléhal elektrochemické redukci při pH 2 při potenciálu, který byl posunut z -526 mV (na nemodifikované elektrodě) na -387 mV na modifikované elektrodě. Současně se citlivost zvýšila faktorem 5,8. Pomocí DPV byl určen lineární rozsah koncentrací $0,09\text{--}8,7 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ a detekční limit a citlivost byly 30 nmol l^{-1} a $512 \text{ nA l } \mu\text{mol}^{-1}$. Modifikovaná elektroda byla aplikována na stanovení NIM v kyselém prostředí ve vzorcích lidského krevního séra bez další předúpravy. Výtěžnosti stanovené metodou standardního přídatku se pohybují od 95,7 do 98,7 % s s_r přibližně 1,6 % [26].

Další voltametrická metoda pro stanovení NIM založená na redukci nitroskupiny na GCE byla použita v Brittonově-Robinsonově pufru za použití techniky cyklické voltametrie. Byl pozorován jeden katodický a jeden anodický pík. Porovnání výšek a potenciálů píků ukázalo, že tyto píky jsou kvazi-reverzibilní. Stanovení NIM v čisté formě bylo provedeno pomocí adsorpční DC voltametrie. Výška katodického proudového píku se lineárně měnila v rozmezí $4,0 \cdot 10^{-7}\text{--}5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ ($0,116\text{--}14,65 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$). Limity detekce a kvantifikace byly $3,2 \cdot 10^{-8}$ a $1,06 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$. Metoda byla aplikována na farmaceutické formulace s procentuálním výtěžkem v rozmezí 98,00–101,60 % a s_r 0,61–1,46 %. Validita metody byla provedena pro stanovení NIM v lidském séru s přijatelnými výsledky pro biologické vzorky. Nebyla potřeba žádná předúprava vzorků ani postupy extrakce rozpouštědlem [27].

GCE modifikovaná sazemi a fluorovaným polymerem Nafionem byla použita ke stanovení NIM pomocí adsorpční rozpouštěcí voltametrie a DPV. Při prekoncentraci pomocí akumulace trvající 20 s byl získán limit detekce $0,14 \pm 0,06 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$, pro akumulační čas 40 s pak limit detekce roven $0,06 \pm 0,03 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$. Metoda byla ověřena v komerčně dostupných farmaceutických produktech, kde se výtěžnosti pohybovaly v rozmezí 94–99 % [28].

Nanočásticemi ZnFe_2O_4 modifikovaná GCE byla použita pro vývoj metod stanovení NIM ve vzorcích lidské moči a v tabletách pomocí elektroanalytických technik DPV (pro citlivé stanovení), a elektrochemické impedanční spektroskopie a cyklické voltametrie (pro charakterizaci elektrodových dějů na povrchu elektrody). Lineární rozsah byl $0,01\text{--}166 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ a limit detekce pro DPV činil $0,006 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ [29].

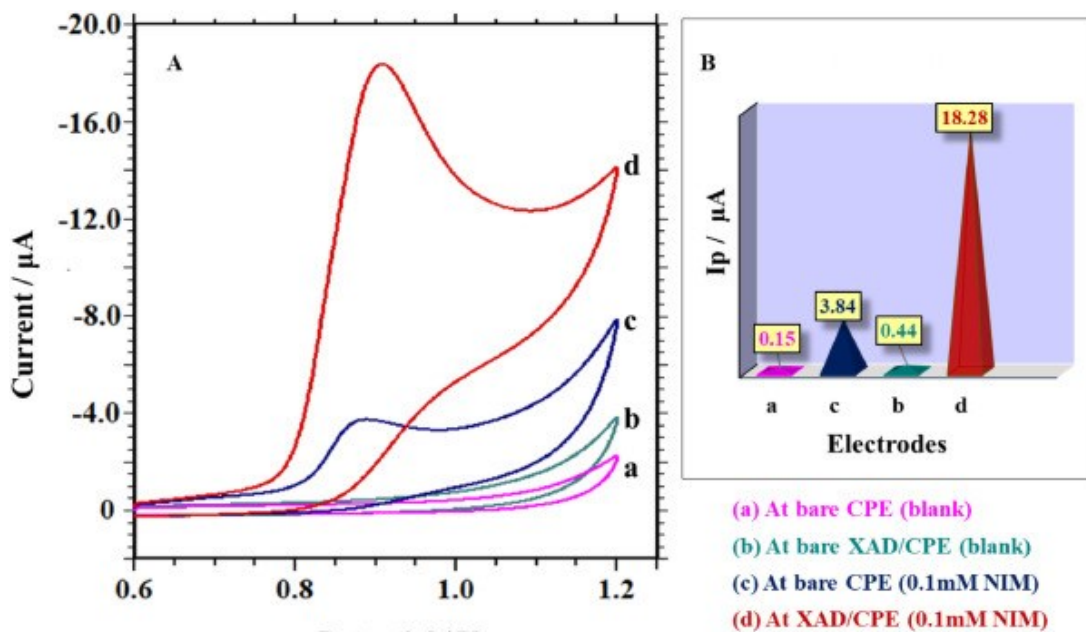
Vložení elektrochemických senzorů do průtokových systémů přispělo k minimalizaci pasivace povrchu pracovní elektrody vzhledem k tomu, že snižuje dobu kontaktu vzorku

s elektrodou. Byl zřízen systém pro průtokovou injekční analýzu (FIA) se dvěma nezávislými kanály umožňujícími umístění ampérometrického detektoru na dvou různých místech – v první pozici je detektor omývaný roztokem se vzorkem, ve druhé pak čistícím roztokem. Optimální analytický signál byl získán při detekčním potenciálu 1,2 V. Jako pracovní elektroda byla použita GCE a metoda byla použita pro stanovení NIM ve farmaceutických přípravcích. Byl získán lineární vztah mezi koncentrací a výškou ampérometrického píku v rozmezí $5,0 \cdot 10^{-5}$ až $3,0 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹ (korelační koeficient 0,9994 pro $n = 6$). Opakovatelnost analytického signálu byla hodnocena pomocí 12 po sobě jdoucích stanovení roztoku NIM i koncentrací $3,0 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹, s dosažením s_r 1,1 %. Mez detekce byla $3,1 \cdot 10^{-6}$ mol l⁻¹ [30]. V případě této studie se nejedná o využití chemické modifikace elektrodového povrchu, ale o modifikaci ve smyslu konstrukční úpravy klasického průtokového jednokanálového ampérometrického detektoru.

Uhlíková pastová elektroda (CPE). Další metodou stanovení aplikovanou na vzorky lidského séra a současně i lékové formy byla DPV na CPE modifikovanou CNT. Metoda poskytla rozmezí registrovatelných koncentrací od $6 \cdot 10^{-8}$ do $1 \cdot 10^{-5}$ mol l⁻¹, s mezí detekce $1,07 \cdot 10^{-9}$ mol l⁻¹ a mezí kvantifikace $3,24 \cdot 10^{-9}$ mol l⁻¹ [13].

Pro stanovení NIM v moči byl využit nový senzor připravený smícháním nanokřemičitého (nanosilika) a grafitového prášku ve vhodném poměru. Nanosilika vykazovala dobrou vodivost při přenosu elektronů zapojených do oxidačního procesu. Nejvyšší odezvy proudu oxidace byly pozorovány ve fosfátovém pufru o pH 5,0. Elektroda byla charakterizována pomocí cyklické voltametrie a DPV byla použita jako metoda pro stanovení NIM. Modifikovaná elektroda poskytla specifický velký povrch, což vedlo k přípravě dobré snímací platformy s vysokou citlivostí a širokým lineárním dynamickým rozsahem $3 \cdot 10^{-5}$ – $1 \cdot 10^{-6}$ mol l⁻¹, s detekčním limitem $1,44 \cdot 10^{-9}$ mol l⁻¹ [31].

CPE modifikovaná pryskyřicí Amberlite XAD-4 byla použita pro výzkum elektrochemického chování a stanovení NIM pomocí cyklické voltametrie (obr. 6) a SWV. Bylo zjištěno, že vyvinutá SWV metoda vykazuje dobrou citlivost a selektivitou a mez detekce je $1,28 \cdot 10^{-8}$ mol l⁻¹. Metoda byla nakonec aplikována na vzorky léčiv s výtěžky 96,0 až 98,6 % s s_r 1,56 % a vzorky moči s výtěžky 90,0 až 97,4 % a s_r bylo 4,33 % [32].



Obrázek 6: (A) Voltametrické chování $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$ NIM ve fosfátovém pufru o pH 7,0 ($I = 0,2 \text{ mol l}^{-1}$); $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$. (B) Variace proudu píku ($I_p/\mu\text{A}$) na nemodifikované elektrodě (CPE) a na elektrodě modifikované pryskyřicí Amberlite XAD-4 (XAD/CPE). Převzato z [32].

Pro stopové stanovení NIM použitelné v moči a tabletách byla použita CPE, jejíž materiál byl smísen s nanojílem. Jako metody zde byly využity cyklická voltametrie a SWV. Nanojíl má elektrokatalytické vlastnosti, a proto byl potenciál anodického píku NIM mírně posunut do zápornějších hodnot. Možný oxidační mechanismus NIM zahrnoval výměnu dvou protonů a dvou elektronů. Byly zjištěny hodnoty meze detekce a kvantifikace $1,01 \text{ nmol l}^{-1}$ a $3,37 \text{ nmol l}^{-1}$ a lineární rozsah $0,01\text{--}0,35 \mu\text{mol l}^{-1}$ [33].

Na CPE s použitím modifikátorů oxidu grafenu a redukované formy oxidu grafenu bylo provedeno stanovení NIM pomocí DPV a SWV. Lineární odezva NIM byla pozorována v rozmezí koncentrací 300 až $0,1 \text{ nmol l}^{-1}$, s detekčními limity $11,2 \text{ nmol l}^{-1}$ (DPV) a $1,08 \text{ nmol l}^{-1}$ (SWV) při použití oxidu grafenu jako modifikátoru a $1,03 \text{ nmol l}^{-1}$ (DPV) a $0,1 \text{ nmol l}^{-1}$ (SWV) při použití redukované formy oxidu grafenu jako modifikátoru. Limity kvantifikace byly stanoveny pro DPV jako $37,1 \text{ nmol l}^{-1}$ (oxid grafenu) a $3,69 \text{ nmol l}^{-1}$ (redukovaný oxid grafenu) a pro SWV jako $3,40 \text{ nmol l}^{-1}$ (oxid grafenu) a $2,96 \text{ nmol l}^{-1}$ (redukovaný oxid grafenu). Při použití cyklické voltametrie bylo zjištěno, že elektrodový proces byl ireverzibilní. Metoda byla aplikována na komerční tablety a vzorky moči s výtěžnostmi v rozmezí od 96,0 do 99,2 % s s_r 2,97 % [34].

Na CPE modifikované jílovým minerálem bentonitem byl s využitím SWV stanoven NIM s limitem detekce $1,1 \cdot 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$ a limitem kvantifikace $8,7 \cdot 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$. Vyvinutá metoda byla úspěšně ověřena na biologických a farmaceutických vzorcích [35].

Další kompozitní elektroda. Pro simultánní stanovení tří léčiv – terbutalinu, NIM a metokarbamolu – byla navržena kompozitní elektroda na bázi oxidu grafitu a polyurethanu modifikovaná β -cyklodextrinem. Za optimálních podmínek byly pro NIM pomocí SWV získán lineární rozsah (a mez detekce) $0,62\text{--}7,3 \mu\text{mol l}^{-1}$ ($0,083 \mu\text{mol l}^{-1}$). Metoda byla aplikována na vzorky říční vody, a vyvinuta tedy pro enviromentální analýzy [36].

Sítotisková uhlíková elektroda. Byl popsán robustní elektrochemický senzor založený na elektrochemicky redukovaných nanostužkách z oxidu grafenu, kterými byla modifikována sítotisková uhlíková elektroda, pro stanovení NIM ve farmaceutických formulacích a biologickém médiu. Ampérometrií ve fosfátovém pufru o pH 7,0 s detekčním potenciálem $-0,60 \text{ V}$ byl studován lineární rozsah koncentrací $1,0 \cdot 10^{-8}\text{--}1,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ a získán detekční limit byl $3,50 (\pm 1,57) \text{ nmol l}^{-1}$. Výtěžky na reálných vzorcích se pohybovaly mezi 96,8 a 98,6 % [37].

2.4.3 Zlatá elektroda

Pro individuální a současné stanovení NIM a acetaminofenu byla vytvořena zlatá elektroda modifikovaná L-cysteinem a zlatými nanočásticemi. Elektrochemické chování dvojice analytů bylo studováno pomocí SWV, cyklické voltametrie a elektrochemické impedanční spektroskopie. Studie ukázaly, že oxidace NIM je urychlena při použití modifikované zlaté elektrody poskytující dobře definovaný pík pro NIM při $1,072 \text{ V}$. Simultánní stanovení těchto léčiv bylo možné v lineárním pracovním rozsahu $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ až $3,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, s detekčním limitem $6,49 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ pro NIM a individuální stanovení bylo možné v lineárním pracovním rozsahu $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ až $4,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, s detekčním limitem $4,52 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$. Senzor byl dále úspěšně použit pro současné i individuální stanovení acetaminofenu i NIM ve farmaceutických formulacích [38].

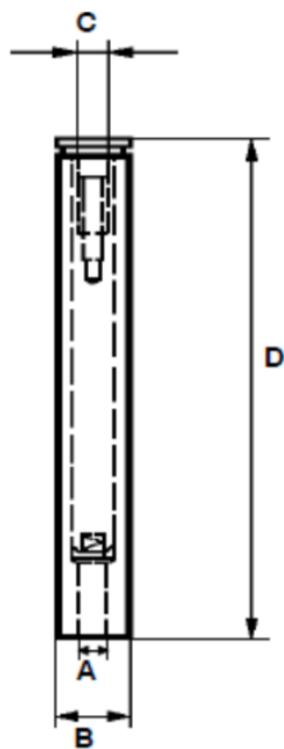
Elektrooxidace NIM byla zkoumána cyklickou a diferenční pulzní voltametrií na zlaté elektrodě. Oxidační elektrodový proces byl ireverzibilní. Byla vyvinuta DPV metoda pro stanovení NIM ve farmaceutických přípravcích. Pomocí metody standardního přídatku byla stanovena výtěžnost 97,3 až 100,2 %. Lineární odezva byla získána v rozsahu koncentrací $2,0 \cdot 10^{-7}$ až $1,2 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$, s detekčním limitem $1,11 \cdot 10^{-9} \text{ mol l}^{-1}$, s dobrou selektivitou a citlivostí. Navržená metoda byla také použita pro důkaz NIM v moči jako reálného vzorku [39].

2.5 Pracovní elektroda

Pro měření byla v této diplomové práci použita pracovní kompozitní elektroda z ultračistého grafitu (UTGE; kat. č. 6.1204.100, Metrohm, Švýcarsko). Elektroda je znázorněna na obr. 7. Obr. 8 dále popisuje schéma poskytované výrobcem. Elektroda má tvar dutého válce (vyroben z polyetherketonu (PEEK)) s vnitřním průměrem 2 mm, který je naplněn kompozitem tvořeným ultračistým grafitem a epoxidovou pryskyřicí [40]. UTGE má stále stabilní jednotný povrch, který je obnovitelný, protože lze oleštit o aluminu a to je značná výhoda této elektrody [41].



Obrázek 7: UTGE; převzato z www.metrohm.com.



Obrázek 8: Schéma UTGE: A – vnitřní průměr 2 mm, B – vnější průměr 7 mm, C – elektrický kontakt o velikosti M3 (3 mm), D – celková délka elektrody 52,5 mm; převzato z www.metrohm.com.

3. Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

- Dvousložkový Brittonův-Robinsonův pufr (BR pufr)
 - Kyselá složka pufru ($0,04 \text{ mol l}^{-1}$, 1000 ml)
 - 2,71 ml 85% kyseliny fosforečné (p.a., Lach-Ner, Neratovice)
 - 2,31 ml 99% kyseliny octové (p.a., Penta, Praha)
 - 2,47 g pevné kyseliny borité (p.a., Lachema, Brno)
 - doplnění deionizovanou vodou (Millipore Q-Plus systém, Millipore, USA)
 - Bazická složka pufru ($0,2 \text{ mol l}^{-1}$, 1000 ml)
 - 8,0 g pevného hydroxidu sodného (p.a., Lach-Ner, Neratovice)
 - doplnění deionizovanou vodou (Millipore Q-Plus systém, Millipore, USA)
- Nimesulid (Sigma-Aldrich), zásobní roztok $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$
 - Doplnění ethanolem (96%, p.a., Lach-Ner, Neratovice)

3.2 Přístroje a zařízení

- Analyzátor Eco-Tribo Polarograph (Polaro-Sensors, Praha)
- Program Polar 5.1 (Polaro-Sensors, Praha)
- Tříelektrokové uspořádání
 - Pracovní elektroda UTGE (průměr disku 2 mm, Metrohm, Švýcarsko) bez chemické modifikace
 - Referentní argentchloridová elektroda ($3 \text{ mol l}^{-1} \text{ KCl}$, Monokrystaly, Turnov)
 - Pomocná platinová elektroda (Monokrystaly, Turnov)
- pH-metr Jenway 3510 (Jenway, UK) s kombinovanou skleněnou elektrodou (Jenway, UK), kalibrace standardními pufrů o pH 4,0; 7,0 a 9,0

3.3 Pracovní postupy

Elektrochemická analýza probíhala v tříelektrodevém zapojení s pracovní elektrodou z ultra čistého grafitu (UTGE), referentní argentochloridovou elektrodou ($3 \text{ mol l}^{-1} \text{ KCl}$) a pomocnou platinovou elektrodou. UTGE byla leštěna aluminou (velikost částic $0,5 \text{ }\mu\text{m}$). V uzavřené voltametrické cele bylo vždy 10 ml roztoku a bylo připojeno míchátko a přívod

dusíku (uložený v tlakové láhvi), kterým byl z roztoků odstraňován interferující vzdušný kyslík (probublávání před každou analýzou trvalo 3 min). Parametry při analýzách DCV a DPV byly nastaveny takto: polarizační rychlost 20 mV s^{-1} (pro DCV i DPV), potenciálový krok 3 mV (DCV i DPV), výška pulzu -50 mV (DPV), šířka pulzu 100 ms (DPV), vzorkovací čas 20 ms (DPV) a celková délka pulzu 150 ms (DPV). Počáteční a konečný potenciál byl nastavován různě podle vzniklé potřeby.

Při hledání optimálních podmínek detekce NIM ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) byla proměřena celá škála pH (vzorek analytu byl připraven smícháním $1,0 \text{ ml}$ zásobního roztoku o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, $2,0 \text{ ml}$ ethanolu a $7,0 \text{ ml}$ BR pufru), nejdříve bylo změřeno pH kyselé složky BR pufru ($\text{pH} = 1,9$), následně od $\text{pH} = 2,0$ až po $\text{pH} = 12,0$; vždy bylo měřeno i pH s přídavkem ethanolu (pH^*), zásaditá složka BR pufru měla $\text{pH} = 13,3$. Měření probíhalo v oblasti oxidačních i redukčních potenciálů. Dále byla proměřována opakovatelnost stanovení NIM a zkonstruována jeho kalibrační závislost v rozmezí koncentrací od $0,1 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ do $100 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$.

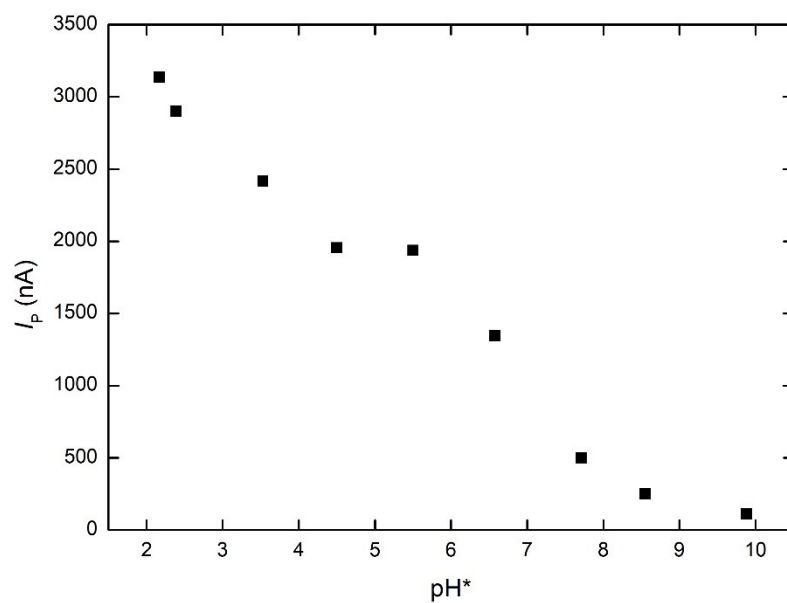
4. Výsledky a diskuze

4.1 Nalezení optimálního pH

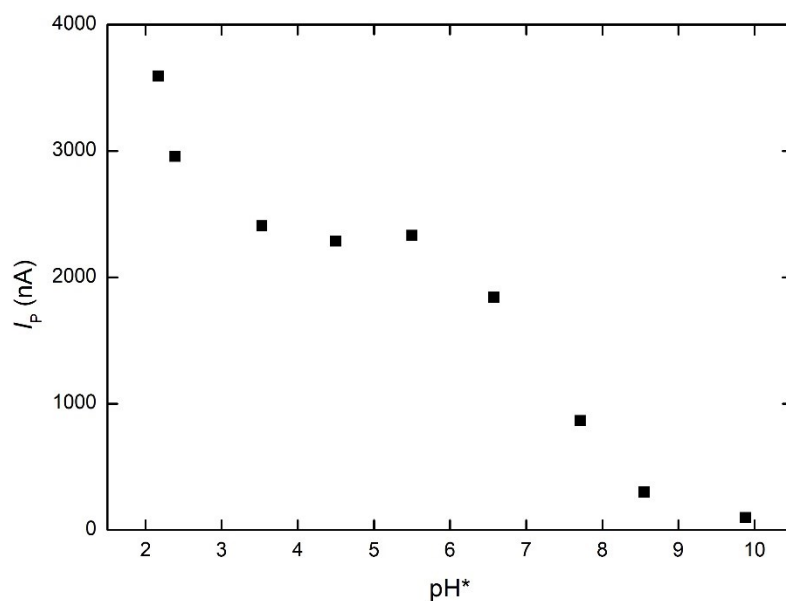
Chování NIM bylo studováno dvěma technikami, a to DC voltametrií (DCV) a diferenční pulzní voltametrií (DPV). Měření probíhalo v oblasti oxidačních i redukčních potenciálů. Ve voltametrické cele byla výsledná koncentrace NIM $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Proměřené bylo v obou případech metod pH 2–12 (realizováno pomocí BR pufru). Hodnota pH vodně-ethanolického prostředí byla zjišťována před každým měřením základního elektrolytu a je zobrazována jako pH*. NIM poskytuje v záporných potenciálech jeden dobře vyvinutý katodický voltametrický pík (viz kapitola 4.1.2) v celé škále pH. V kladných potenciálech lze anodický pík NIM vyhodnotit od pH 1,89 (pH* 2,2) do pH 9,0 (pH* 9,9) (viz kapitola 4.1.1).

4.1.1 Oxidační stanovení NIM

Nejdříve bylo změřeno pH kyselé složky pufru (pH 1,9), byl přidán odpovídající objem zásobního roztoku NIM a doplněn ethanolem a BR pufrům o daném pH v poměru 3:7 (ethanol:BR pufr). Postupně bylo prostředí BR pufru upravováno na hodnoty 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 11,0 a 12,0; poté byly k 7 ml BR pufru o odpovídajícím pH přidány 3 ml ethanolu a opět pomocí pH metru změřeno pH*: 2,2; 2,4; 3,5; 4,5; 5,5; 6,6; 7,7; 8,6; 9,9; 10,8; 11,6 a 12,4 (tyto hodnoty jsou zobrazovány ve všech grafech ukazujících závislost na pH). Takto připravený základní elektrolyt byl pomocí DCV a DPV proměřen ve všech prostředích, totéž bylo provedeno s roztokem vzorku a výsledné píky byly vyhodnoceny. Na obr. 9 je zobrazena závislost proudu píku na pH* u DCV, na obr. 10 závislost proudu píku na pH* u DPV.



Obrázek 9: Závislost proudu píku na pH^* pro NIM ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) měřena pomocí DCV na UTGE v roztocích BR pufrů a ethanolu (7:3).

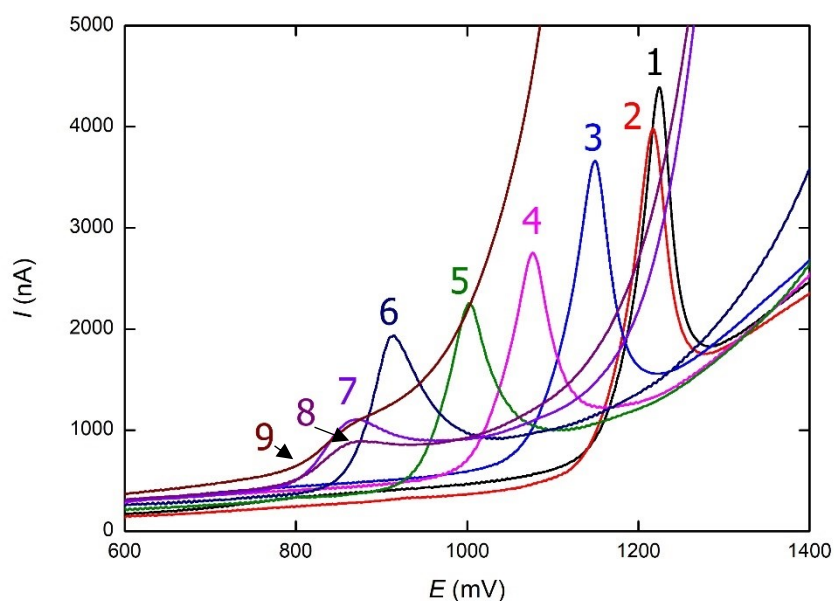


Obrázek 10: Závislost proudu píku na pH^* pro NIM ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) měřena pomocí DPV na UTGE v roztocích BR pufrů a ethanolu (7:3).

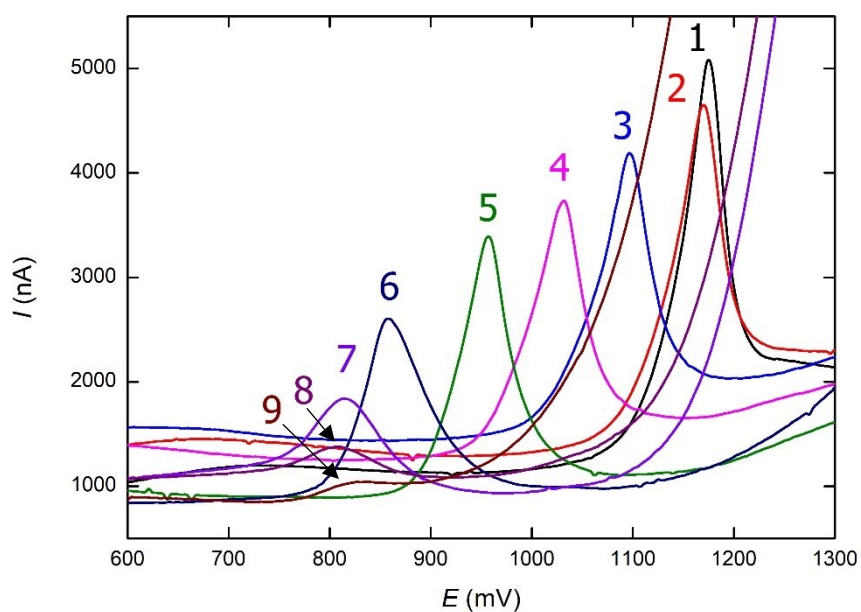
Z grafů na obr. 9 a 10 je patrná klesající výška proudu píku a rostoucím pH . Oběma metodami bylo možné vyhodnotit proud píku pouze do pH 9 ($\text{pH}^* 9,9$). Vidíme zde určité rozdělení elektrochemického chování, kdy do pH 4 (DCV), respektive pH 3 (DPV) má výška

proudu píku klesající charakter, okolo pH 4–5 (DCV), respektive pH 3–5 (DPV) jsou výšky téměř konstantní a dále od pH 5 pozorujeme opět značný pokles výšek píků. Ideální by tedy byla kyselá pH vzhledem k výšce proudu píku, ovšem tato pH mohou mít vyšší směrodatné odchylky opakovaných měření. Další možností jsou pH 4,0 a 5,0 kde se hodnota proudu píku příliš nemění, proto byla pro další následné experimenty zvolena prostředí obsahující BR pufr o pH 2,0; 4,0 a 5,0.

Na obr. 11 a 12 jsou zobrazeny příklady voltametrických záznamů zobrazující zaznamenané DCV a DPV píky. Z křivek je patrný pokles proudu píku až do pH 9, píky v dalších prostředích již není možné vyhodnotit z důvodu nízké výšky proudu píku.

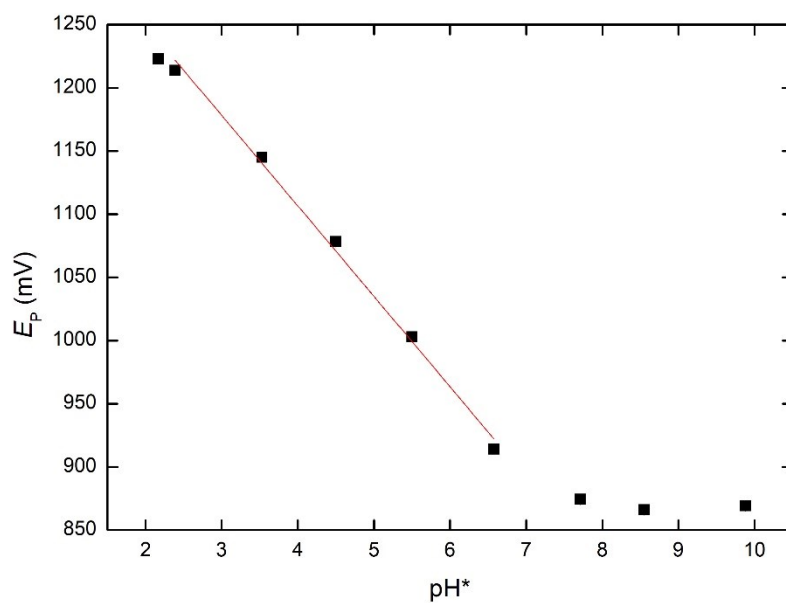


Obrázek 11: DC voltamogramy vzorků NIM ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) zaznamenané na UTGE v roztocích BR pufrů a ethanolu (7:3). pH*: 2,2 (1); 2,4 (2); 3,5 (3); 4,5 (4); 5,5 (5); 6,6 (6); 7,7 (7); 8,6 (8); 9,9 (9).

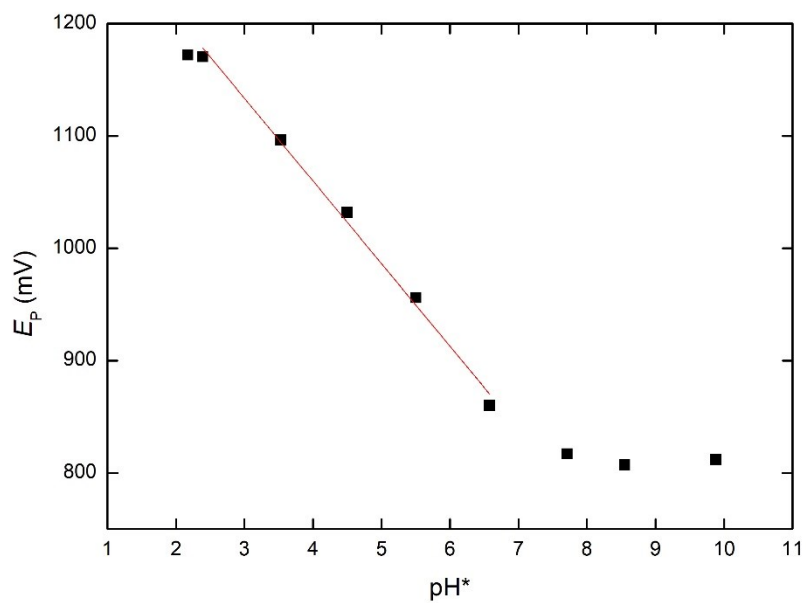


Obrázek 12: DP voltamogramy vzorků NIM ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) zaznamenané na UTGE v roztocích BR pufrů a ethanolu (7:3), pH^* : 2,2(1); 2,4 (2); 3,5 (3); 4,5 (4); 5,5 (5); 6,6 (6); 7,7 (7); 8,6 (8); 9,9 (9).

Dále je na obr. 11 a 12 možné pozorovat trend ve změně potenciálů píku při změně pH, kde je stejně jako na obr. 13 a 14 (závislost potenciálu píku na pH) vidět v určité oblasti pH lineární posun polohy píků k nižším hodnotám až do pH 6, dále se již potenciál příliš nemění. V tab. 1 jsou zobrazeny parametry lineárních regresí z grafů na obr. 13 a 14.



Obrázek 13: Graf závislosti potenciálu píku NIM na pH^* . Vzorek NIM ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) měřen pomocí DCV na UTGE v roztocích BR pufrů a ethanolu (7:3). V grafu je vytvořena lineární regrese v úseku $pH^* 2,4 - 6,6$.

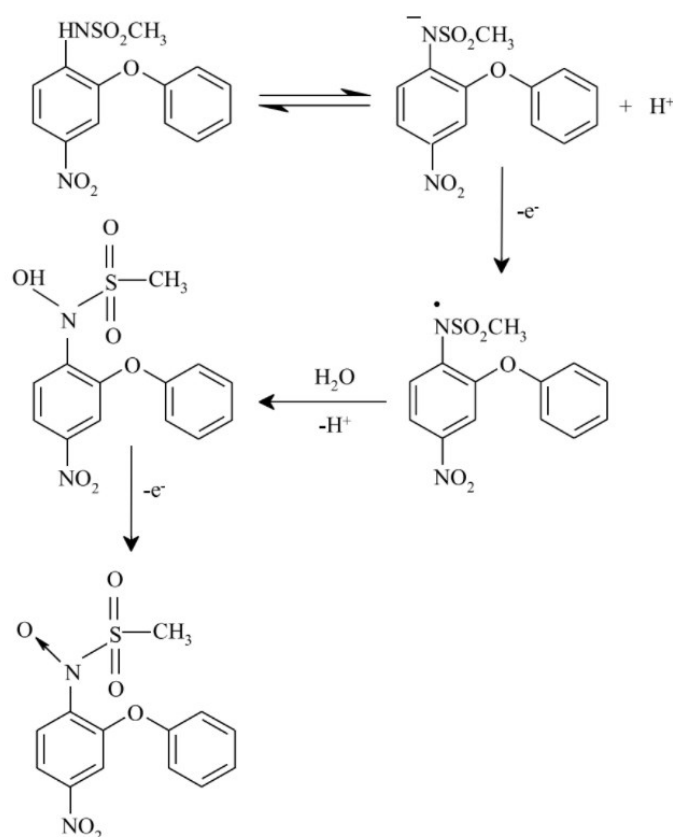


Obrázek 14: Graf závislosti potenciálu píku NIM na pH^* . Vzorek NIM ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) měřen pomocí DPV na UTGE v roztocích BR pufrů a ethanolu (7:3). V grafu je vytvořena lineární regrese v úseku $pH^* 2,4 - 6,6$.

Tabulka 1: Parametry lineárních regresí z grafů na obr. 13 a 14 (závislost potenciálu píku NIM na pH*). Vzorek NIM ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) měřen pomocí uvedených metod na UTGE v roztocích BR pufrů a ethanolu (7:3).

Metoda	Směrnice ($\text{mV } \{\text{pH}^*\}^{-1}$)	Úsek (nA)	Korelační koeficient
DCV	-71,6	1393	-0,9980
DPV	-73,6	1354	-0,9976

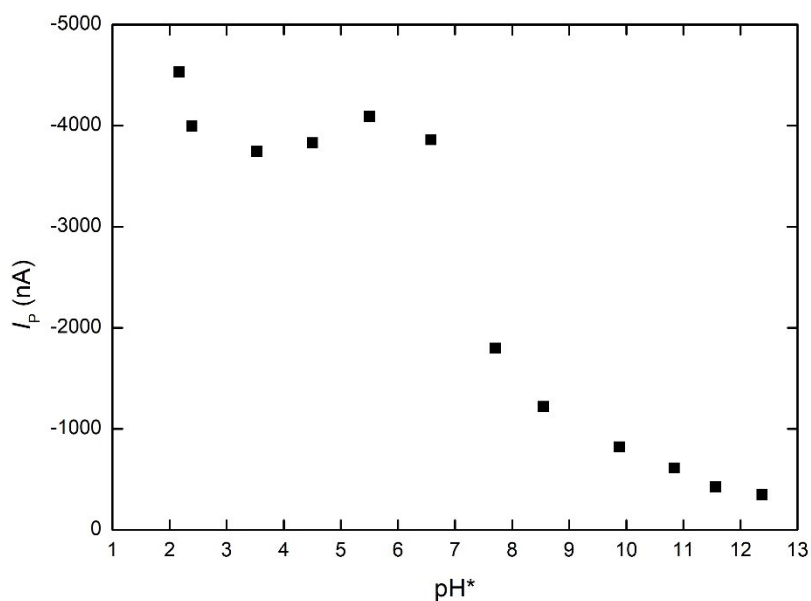
Z Nernstovy rovnice aplikované na tento konkrétní elektrochemický děj (anodická oxidace NIM) vyplývá, že počet vyměňovaných H^+ iontů a elektronů by měl být stejný (hodnoty směrníc v tab. 1 jsou blízké teoretické hodnotě -59 mV , která by pro takovýto děj byla teoreticky získána). Pravděpodobný mechanismus elektrochemické oxidace NIM je zobrazen na obr. 15, kde lze vidět, že se celkové elektrodové reakce účastní dva H^+ ionty a dva elektrony, což je v souladu s výše uvedeným tvrzením. Od pH 7 do zásaditějších pH byl potenciál prakticky nezávislý na pH (elektrodová reakce zde pravděpodobně probíhá pomaleji). Přechod v těchto dvou popsáných trendech nastal kolem $\text{pH}^* 6,8$, což je hodnota, která by měla odpovídat zveřejněné hodnotě pK_a pro NIM rovné $6,5$ [5,42].



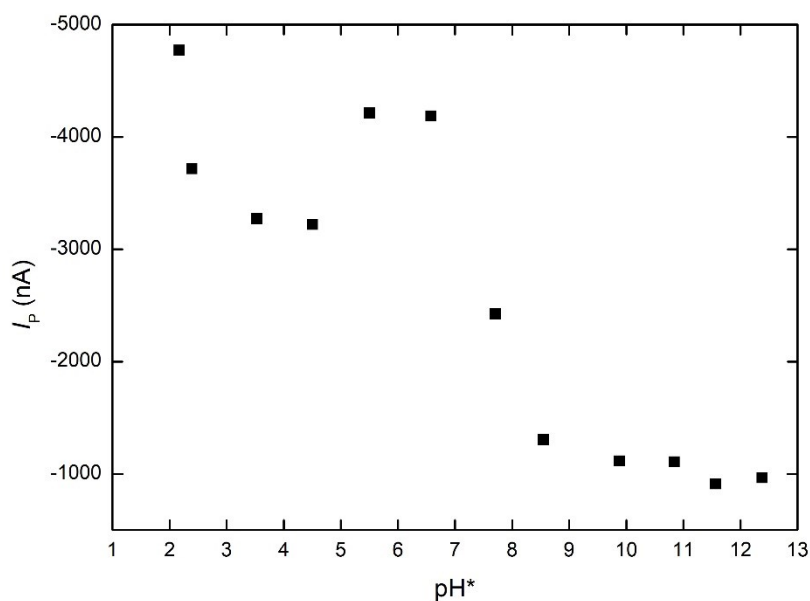
Obrázek 15: Pravděpodobný mechanismus elektrochemické oxidace NIM. Převzato z [42]

4.1.2 Redukční stanovení NIM

Měření v redukční oblasti potenciálů probíhalo stejným postupem jako v kapitole 4.1.1. Opět byla proměřena oběma technikami všechna prostředí BR pufru o pH 2–12 a ethanolu (7:3) a píky následně vyhodnoceny. Na obr. 16 je zobrazena závislost proudu píku na pH* u DCV, na obr. 17 závislost proudu píku na pH* u DPV.



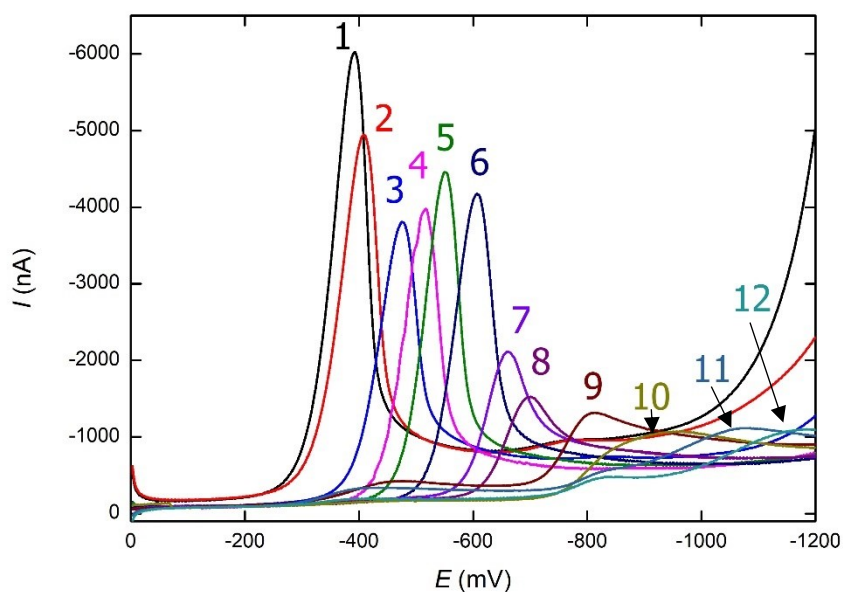
Obrázek 16: Závislost proudu píku na pH* pro NIM ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) měřena pomocí DCV na UTGE v roztocích BR pufrů a ethanolu (7:3).



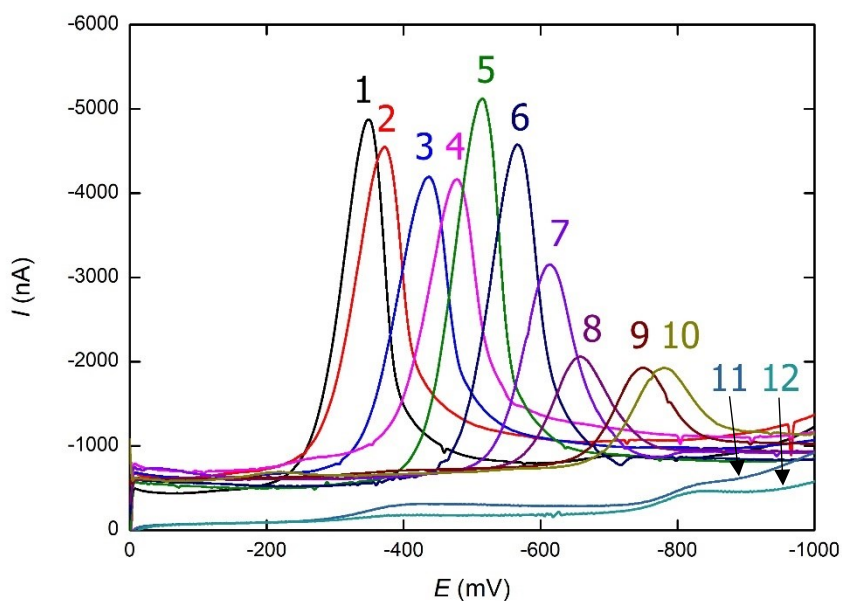
Obrázek 17: Závislost proudu píku na pH^* pro NIM ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) měřena pomocí DPV na UTGE v roztocích BR pufrů a ethanolu (7:3).

Z grafů na obr. 16 a 17 vidíme podobný trend jako u oxidačních stanovení. Oběma technikami bylo možné vyhodnotit proud píku v celé škále pH, protože výšky píků byly dostatečně dobře vyhodnotitelné a obecně vyšší než u oxidačního stanovení. Vidíme opět rozdělení elektrochemického chování, kdy do pH BR pufru 3 (DCV), respektive pH 4 (DPV) má výška píku klesající charakter, okolo pH 4–6 (DCV), respektive pH 5–6 (DPV) jsou výšky píků větší a drží se na podobných hodnotách a dále od pH 7 pozorujeme značný pokles výšek píků. U techniky DCV lze postupovat v určení optimálního pH obdobně jako u oxidačního stanovení, tudíž bylo zvoleno pro další měření pH BR pufru 2,0 a dále pH 4,0 a pH 5,0, protože zde jsou hodnoty výšek píků konstantnější (velký rozdíl byl pozorovatelný mezi hodnotami v prostředí o pH 6,0 a o pH 7,0 použitého BR pufru). U DPV byla zvolena pro další měření tatož prostředí, přičemž z hlediska velikosti proudu píku bylo později preferováno spíše prostředí s pH BR pufru 2,0 a 5,0.

Na obr. 18 a 19 jsou zobrazeny příklady DCV a DPV píků. Píky lze vyhodnotit v celé škále zkoumaných pH. Na obr. 18 v prostředích o pH BR pufru 11,0 a 12,0 můžeme vidět rozdělení píku na dva.



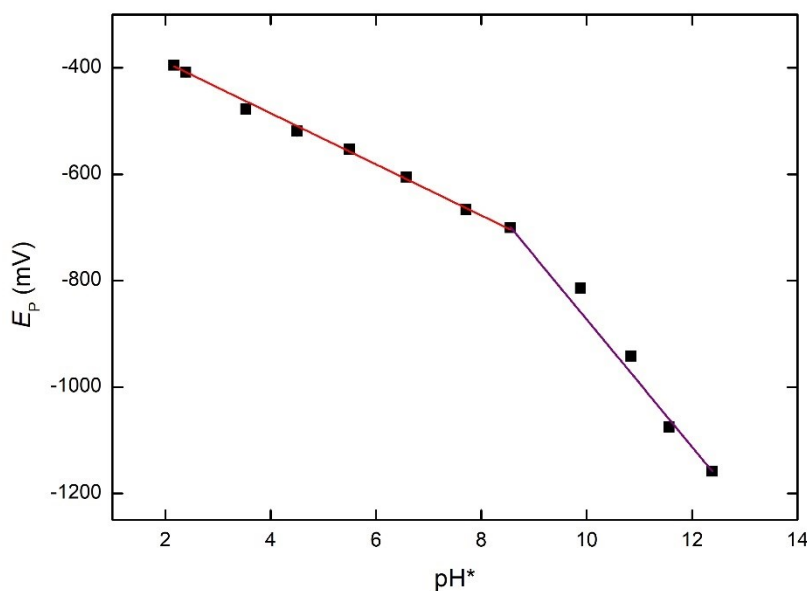
Obrázek 18: DC voltamogramy vzorků NIM ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) zaznamenané na UTGE v roztocích BR pufrů a ethanolu (7:3). pH^* : 2,2 (1); 2,4 (2); 3,5 (3); 4,5 (4); 5,5 (5); 6,6 (6); 7,7 (7); 8,6 (8); 9,9 (9); 10,8 (10); 11,6 (11) a 12,4 (12).



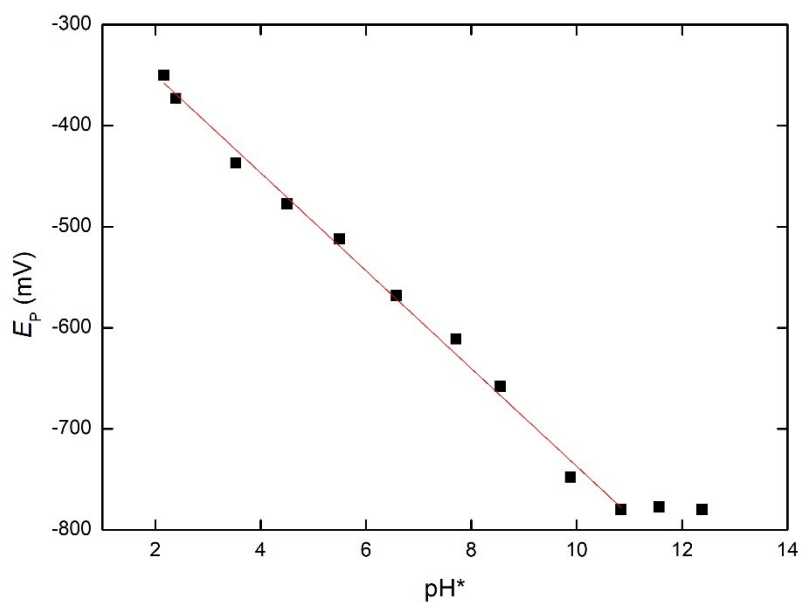
Obrázek 19: DP voltamogramy vzorků NIM ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) zaznamenané na UTGE v roztocích BR pufrů a ethanolu (7:3). pH^* : pH 2,2 (1); 2,4 (2); 3,5 (3); 4,5 (4); 5,5 (5); 6,6 (6); 7,7 (7); 8,6 (8); 9,9 (9); 10,8 (10); 11,6 (11) a 12,4 (12).

Dále na obr. 18 a 19 pozorujeme opět posun potenciálu píků, kde je stejně jako na obr. 20 a 21 (závislost potenciálu píku na pH^*) vidět lineární posun polohy píků k negativnějším hodnotám se zvyšujícím se pH . U DCV na obr. 20 můžeme vidět dvě lineární regrese a zlom

při pH 8. Parametry lineárních regresí jsou popsány v tab. 2, stejně jako u lineární regrese na obr. 21. Tam potenciál lineárně klesá až do pH 10, poté se již příliš nemění. Z Nernstovy rovnice můžeme určit, že se na elektrodové reakci při derukci NIM opět podílí stejný počet elektronů a H^+ iontů. Pravděpodobný mechanismus reakce je zobrazen na obr. 22., kde v rovnici (1) vidíme výměnu stejného počtu elektronů a H^+ iontů, tento mechanismus převládá v kyselých pH při dostatku H^+ iontů, tedy v intervalu pH^* 2,2–8,6 u DCV a pH^* 2,2–10,8 u DPV. Dále pak rovnice (2) popisuje reakci v zásaditých pH, kde není dostatek H^+ iontů, a reakce proto probíhá pomaleji s meziproduktem ve formě nitroradikálového anionotu, důsledkem toho se pak u DCV mění směrnice v druhé lineární regresi a u DPV se potenciál od pH^* 10,8 příliš nemění.



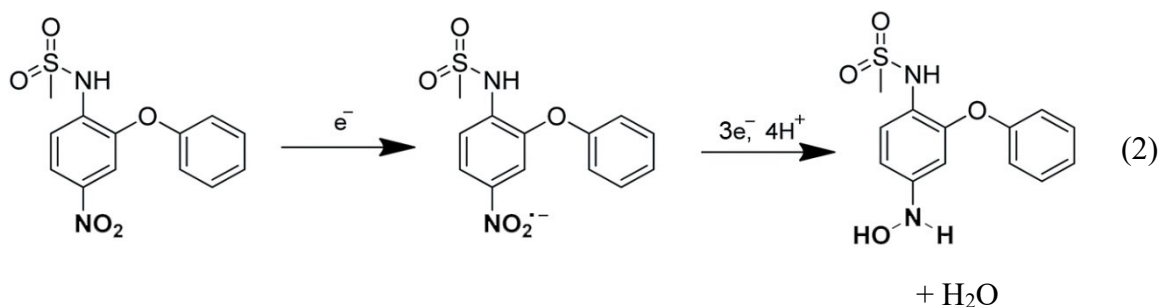
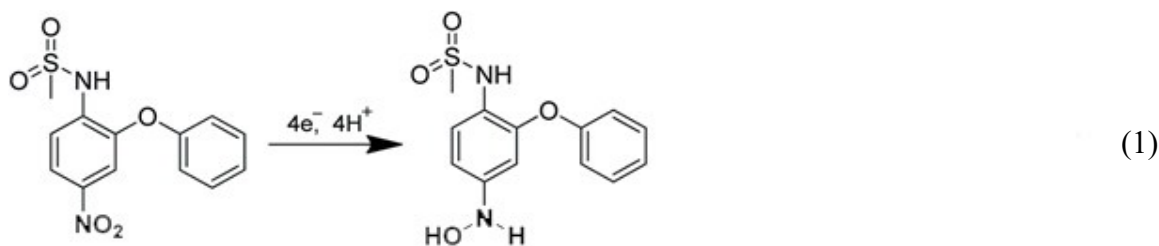
Obrázek 20: Graf závislosti potenciálu píku NIM na pH^* . Vzorek NIM ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) měřen pomocí DCV na UTGE v roztocích BR pufrů a ethanolu (7:3). V grafu jsou vytvořeny lineární regrese v úseku pH^* 2,2 – 8,6 a 8,6 – 12,4.



Obrázek 21: Graf závislosti potenciálu píku NIM na pH*. Vzorek NIM ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) měřen pomocí DPV na UTGE v roztocích BR pufrů a ethanolu (7:3). V grafu je vytvořena lineární regrese v úseku pH* 2,2 – 10,8.

Tabulka 2: Parametry lineárních regresí z grafů na obr. 19 a 20 (závislosti potenciálu píku na pH*). Vzorek NIM ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) měřen pomocí daných metod na UTGE v roztocích BR pufrů a ethanolu (7:3).

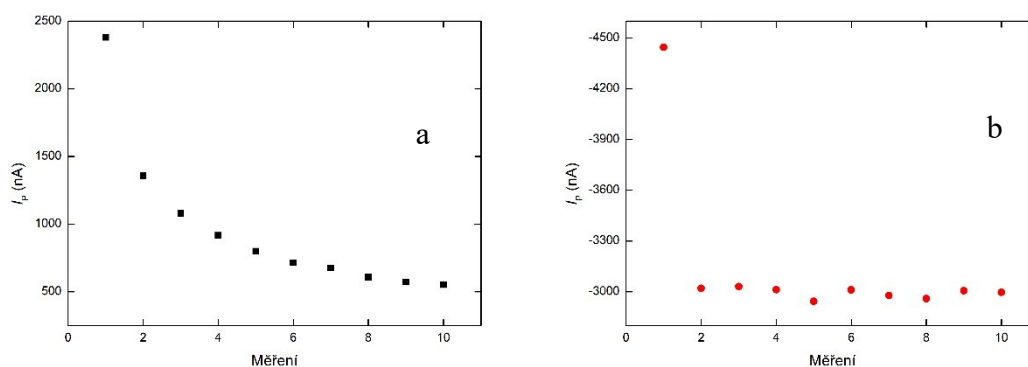
Metoda	Interval pH*	Směrnice (mV {pH*} ⁻¹)	Úsek (nA)	Korelační koeficient
DCV	2,2–8,6	-48,10	-292,8	-0,9960
	8,6–12,4	-119,8	325,3	-0,9996
DPV	2,2–10,8	-48,42	-252,9	-0,9976



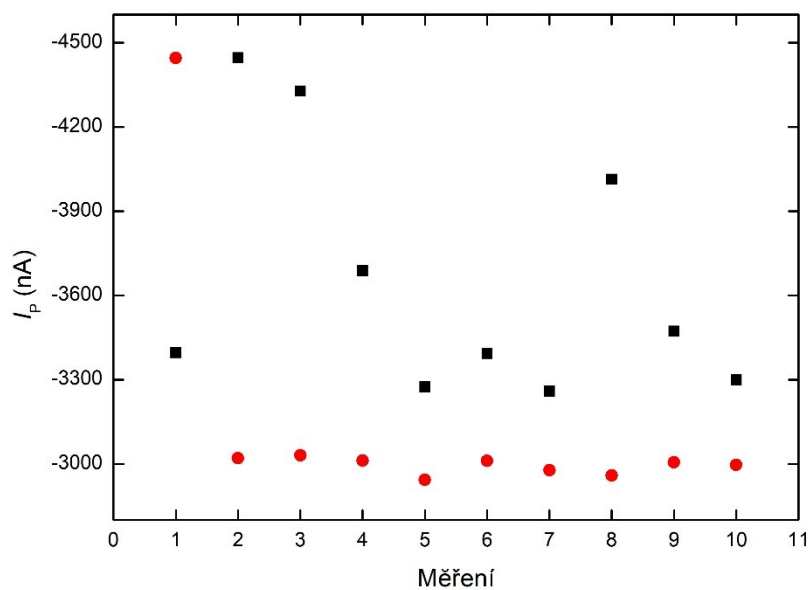
Obrázek 22: Pravděpodobné schéma elektrochemické redukce NIM: (1) pro kyselá pH, (2) pro zásaditá pH.

4.2 Opakovatelnost měření

Pro DCV a DPV byla ve vybraných prostředích dále zkoumána opakovatelnost stanovení pro možnost volby optimálních podmínek. Relativní směrodatná odchylka (s_r) byla stanovena z deseti (bez oleštění povrchu pracovní elektrody z devíti) měření, a to dvěma způsoby. Jednou byla elektroda oleštěna aluminou vždy před sérií deseti měření (do výsledků je pak započítáno pouze měření 2–10) a při druhém způsobu byla elektroda oleštěna před každým měřením v sérii. Výsledné relativní směrodatné odchylky jsou uvedeny v tab. 3. Dále obr. 23 zobrazuje rozdíl opakovatelnosti u oxidačního a redukčního DCV stanovení NIM. U oxidačního stanovení NIM (obr. 23a) mají hodnoty výšek píků klesající charakter, to pravděpodobně znamená, že se elektroda při opakovaných stanoveních stále více pasivuje, avšak od osmého měření je tento rozdíl již zanedbatelný a výšky píků se ustalují. Dále vidíme, že první bod, a tudíž první měření, vykazuje nejvyšší proud píku, opět důvodem masivního poklesu může být pasivace a znečištění povrchu pracovní elektrody. Stejný rozdíl prvního a dalších měření vidíme i u redukčního stanovení NIM (obr. 23b), avšak dále již hodnoty proudu píků neklesají. Jelikož mělo první měření vyšší hodnotu proudu píku, byla opakovatelnost proměřena s oleštěním pracovní elektrody aluminou před každým jedním záznamem. Rozdíl mezi výsledky vyhodnocení opakovatelnosti s oleštěním elektrody a bez oleštění jsou pro techniku DCV zobrazeny na obr. 24.



Obrázek 23: Graf závislosti proudu piku NIM ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na pořadovém čísle měření. Měřeno pomocí DCV na UTGE v roztoku BR pufru o pH 5,0 a ethanolu (7:3): (a) proud piku oxidace NIM, (b) proud piku redukce NIM.



Obrázek 24: Graf závislosti proudu piku NIM ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na pořadovém čísle měření. Měřeno pomocí DCV na UTGE v roztoku BR pufru o pH 2,0 a ethanolu (7:3). Červené body jsou hodnoty bez dalšího oleštění povrchu pracovní elektrody, černé body jsou hodnoty s oleštěním povrchu pracovní elektrody před každým měřením.

Tabulka 3: Relativní směrodatné odchylky v % vyhodnocené z deseti (*devíti) stanovení NIM ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$). U hodnot s hvězdičkou se povrch pracovní elektrody oleštil pouze před prvním měřením v sérii. Hodnoty pH odpovídají pH BR pufru použitého ve směsi s ethanolem (7:3)

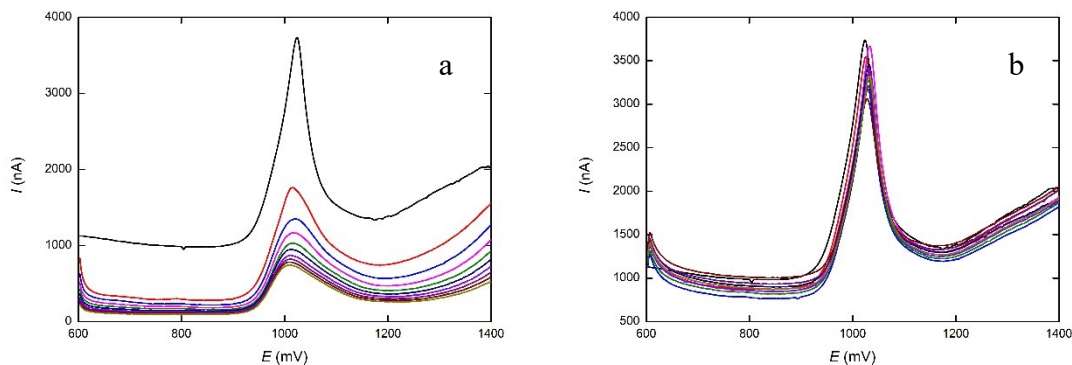
	Oxidace		Redukce	
	DCV	DPV	DCV	DPV
pH 2,0	15	15	12	6
	*33	*28	*1	*2
pH 4,0	13	10	8	8
	*31	*28	*2	*2
pH 5,0	17	21	9	6
	*27	*27	*2	*2

Na obr. 24 vidíme, že pokud se elektroda oleštil pouze před prvním měřením v sérii, hodnoty od měření 2 do měření 10 jsou při redukčních stanoveních poměrně stabilní (červené body), rozdíl mezi 1. měřením a dalšími je pravděpodobně způsoben pasivací a znečištěním elektrody. Pokud se elektroda leští před každým měřením, jsou rozdíly mezi hodnotami větší (černé body), ačkoliv je vyšší proud píku, a proto jsou hodnoty snáze vyhodnotitelné, protože nepůsobí tolik vliv pasivace elektrody.

V tab. 3 jsou prezentovány relativní směrodatné odchylky ve třech prostředích. Vidíme, že u redukčních stanovení jsou směrodatné odchylky obecně menší, nejmenší pak u metody bez oleštění povrchu pracovní elektrody (s hvězdičkou). U oxidačních stanovení je situace opačná, vzhledem ke stálé pasivaci a znečišťování elektrody hodnoty při měření bez oleštění elektrody stále klesají, proto je směrodatná odchylka vyšší než u metody s oleštěním před každým měřením, kde se pasivace a znečištění tolik neprojeví. U oxidačních stanovení tudíž bylo dále pokračováno pouze s metodou oleštění elektrody před každým měřením a prostředí bylo zvoleno pro další měření technikami DCV i DPV shodné, tedy BR pufr o pH 2,0–ethanol (7:3), kvůli nízkým relativním směrodatným odchylkám a dostatečné výšce proudu píku, a dále ze stejných důvodů prostředí BR pufr o pH 4,0–ethanol (7:3). U redukčních stanovení bylo dále měřeno oběma metodami (DCV i DPV) vzhledem k nízkým získaným směrodatným odchylkám (dobré opakovatelnosti stanovení) a prostředí bylo vybráno BR pufr o pH 2,0–ethanol (7:3) u DCV i DPV (z hlediska výšky proudu píku) a dále BR pufr o pH 4,0–ethanol (7:3) u DCV a BR pufr o pH 5,0–ethanol (7:3) u DPV (kvůli směrodatným odchylkám).

Na obr. 25 jsou zobrazeny příklady DP voltamogramů v prostředí BR pufr o pH 4,0–

ethanol (7:3) bez oleštění a s oleštěním povrchu pracovní elektrody. U obr. 25a vidíme opět stále klesající proud píku typický pro oxidační stanovení. U obr. 25b je patrná menší relativní směrodatná odchylka a vyšší proud píku u všech měření.



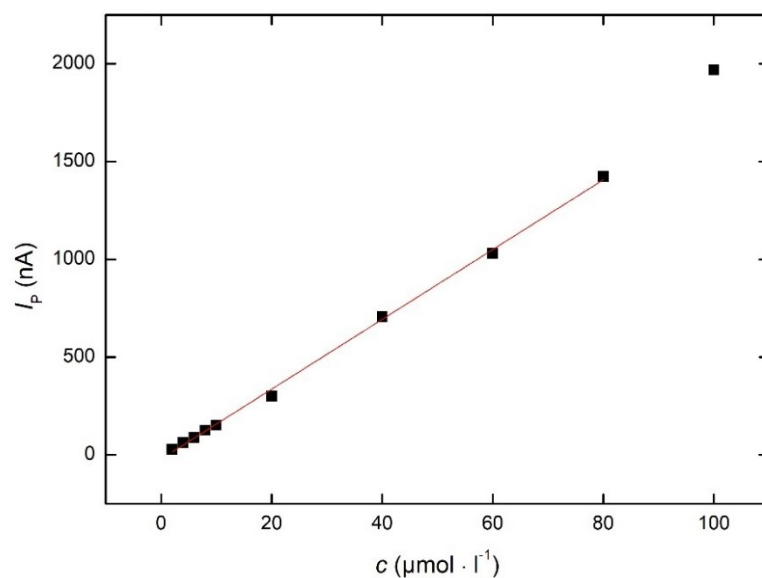
Obrázek 25: DP voltamogramy vzorku NIM ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) zaznamenané pomocí DPV na UTGE v roztoku BR pufru o pH 4,0 a ethanolu (7:3): (a) oleštění povrchu pracovní elektrody před prvním měřením, (b) oleštění povrchu pracovní elektrody před každým měřením.

4.3 Kalibrační závislosti

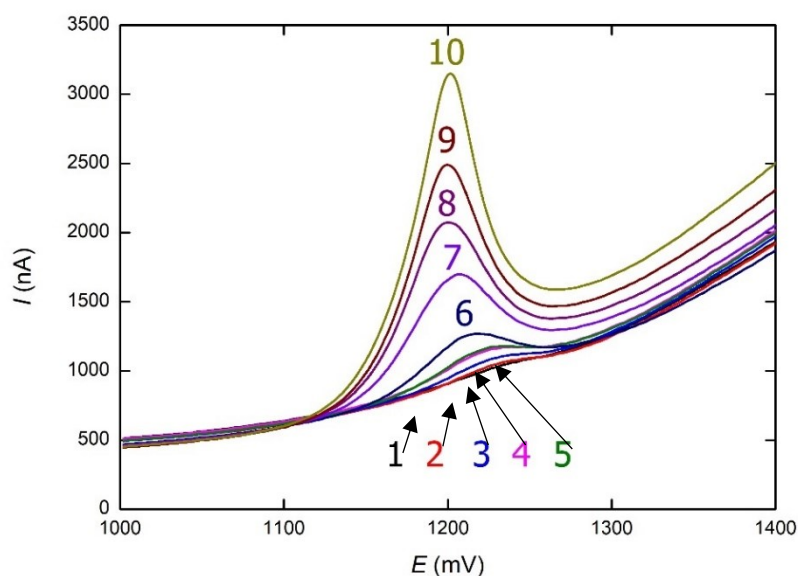
Dále bylo zjišťováno koncentrační rozmezí, kde NIM poskytuje lineární kalibrační závislost. Měření probíhalo oběma metodami (DPV i DCV) na UTGE ve výše stanovených podmínkách měření. Dané prostředí o konkrétním pH bylo tvořeno BR pufrům a ethanol (7:3) s NIM. Vždy byly proměřeny vzorky ve třech koncentračních řádech ($1 \cdot 10^{-7}$, $1 \cdot 10^{-6}$ a $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$). Měření probíhalo vždy desetkrát pro každou koncentraci. U měření bez oleštění elektrody byla vždy vyloučena první hodnota kvůli velkému rozdílu způsobenému pasivací elektrody.

4.3.1 Oxidační stanovení NIM

V oxidační části měření byla zvolena prostředí BR pufru o pH 2,0–ethanol (7:3) a BR pufr o pH 4,0–ethanol (7:3) u obou metod. Zde probíhalo měření pouze s oleštěním povrchu pracovní elektrody, vzhledem k malé výšce píků a opakovatelnosti (velké relativní směrodatné odchylce) by měření bez oleštění nemělo smysl. Píky prvního koncentračního řádu $10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ nebylo možné vyhodnotit. DCV v prostředí BR pufru o pH 2,0–ethanol (7:3) poskytlo znatelné píky od koncentrace $2 \mu\text{mol l}^{-1}$. Lineární kalibrační závislost pak byla získána v koncentračním rozmezí od 2 do $80 \mu\text{mol l}^{-1}$. Tato skutečnost je zobrazena na obr. 26. Obr. 27 ukazuje příslušné DC voltamogramy. Parametry lineární regrese kalibrační přímky jsou uvedeny v tab. 4.

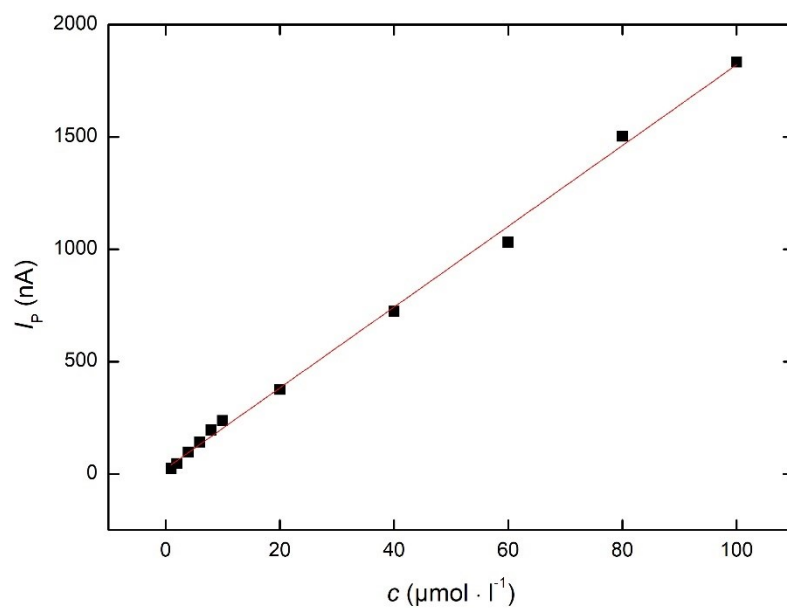


Obrázek 26: Kalibrační závislost pro NIM. Měřeno na UTGE pomocí DCV v prostředí BR pufru o pH 2,0 a ethanolu (7:3). V grafu zobrazena lineární regrese od 2 do 80 $\mu\text{mol l}^{-1}$.

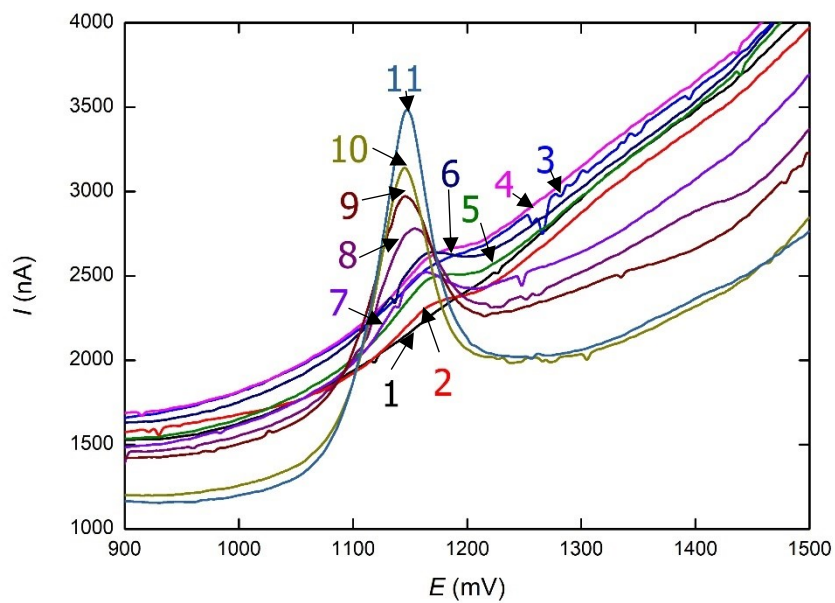


Obrázek 27: DC voltamogramy NIM při různých koncentracích. Měřeno na UTGE pomocí DCV v prostředí BR pufru o pH 2,0 a ethanolu (7:3). Koncentrace: 2 (1), 4 (2), 6 (3), 8 (4), 10 (5), 20 (6), 40 (7), 60 (8), 80 (9), 100 (10) $\mu\text{mol l}^{-1}$.

DPV v prostředí BR pufru o pH 2,0–ethanol (7:3) poskytlo znatelné píky od koncentrace 1 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Lineární kalibrační závislost pak byla od 1 do 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Tato skutečnost je zobrazena na obr. 28. Obr. 29 ukazuje příslušné DP voltamogramy. Parametry lineární regrese jsou uvedeny v tab. 4.



Obrázek 28: Kalibrační závislost pro NIM. Měřeno na UTGE pomocí DPV v prostředí BR pufru o pH 2,0 a ethanolu (7:3). V grafu zobrazena lineární regrese od 1 do 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

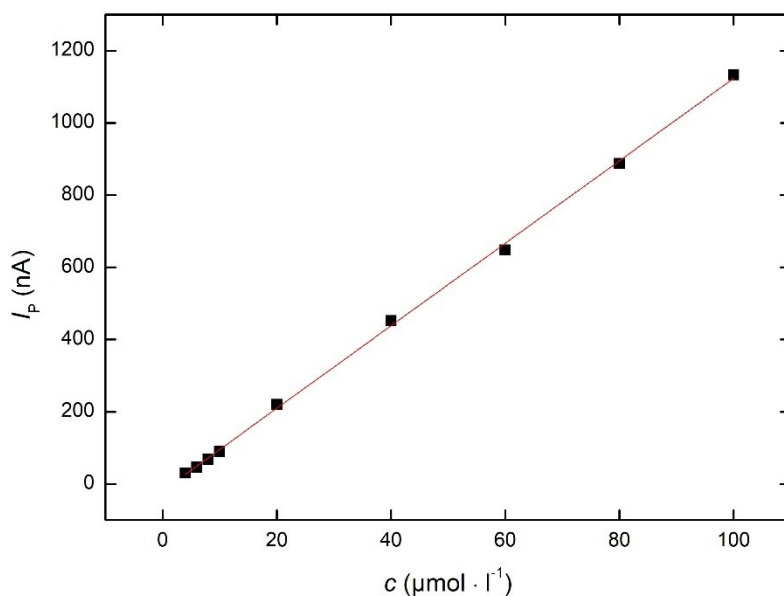


Obrázek 29: DP voltamogramy NIM při různých koncentracích. Měřeno na UTGE pomocí DPV v prostředí BR pufru o pH 2,0 a ethanolu (7:3). Koncentrace: 1 (1), 2 (2), 4 (3), 6 (4), 8 (5), 10 (6), 20 (7), 40 (8), 60 (9), 80 (10), 100 (11) $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

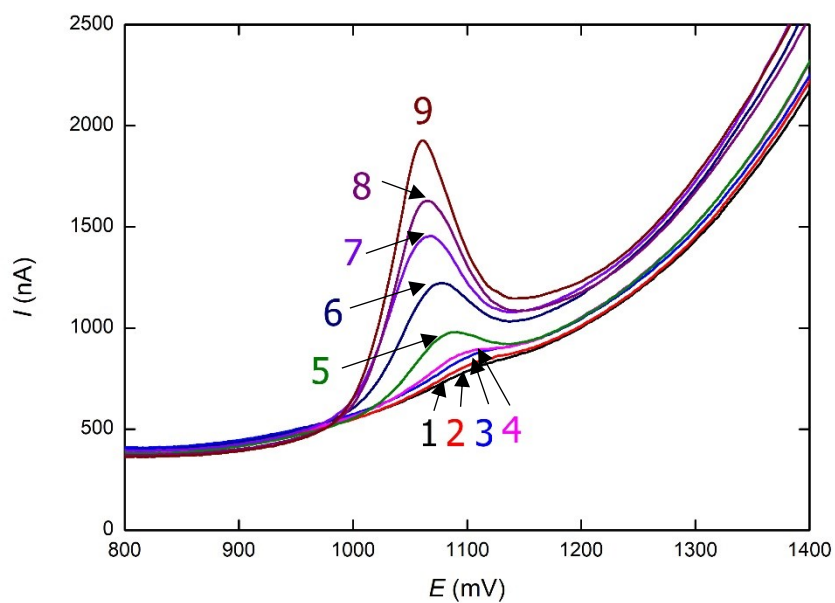
Tabulka 4: Parametry kalibračních přímek pro oxidační stanovení NIM, měřeno na UTGE v prostředí BR pufru o pH 2,0 a ethanolu (7:3).

Metoda	Směrnice (nA 1 μmol^{-1})	Úsek (nA)	Korelační koeficient	LOD (mol l ⁻¹)
DCV	17,85	-20,55	0,9994	$7,18 \cdot 10^{-7}$
DPV	17,98	23,17	0,9988	$3,79 \cdot 10^{-7}$

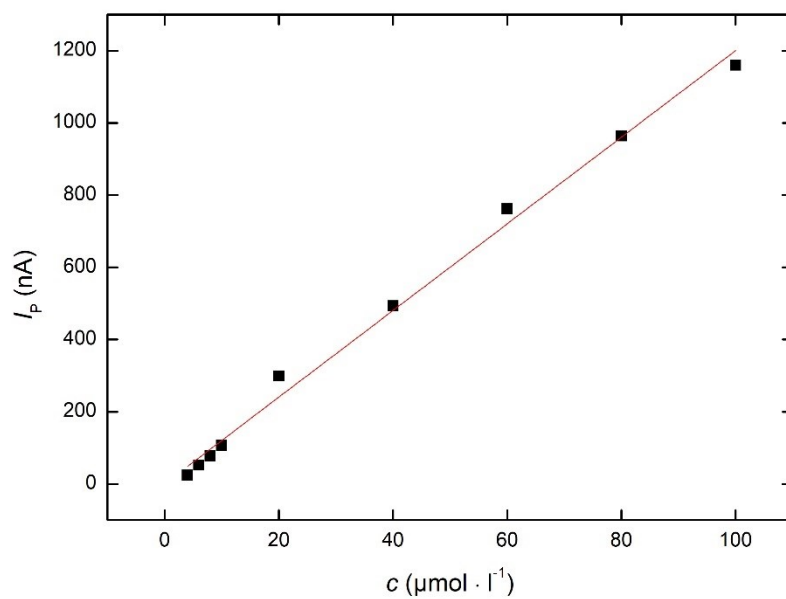
DCV i DPV v prostředí BR pufru o pH 4,0–ethanol (7:3) poskytly znatelné píky od koncentrace 4 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Lineární kalibrační závislost byla od 4 do 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Kalibrační závislost je zobrazena na obr. 30 pro DCV a na obr. 32 pro DPV. Obr. 31 (DCV) a 33 (DPV) ukazují příslušné voltamogramy. Parametry lineárních regresí jsou uvedeny v tab. 5.



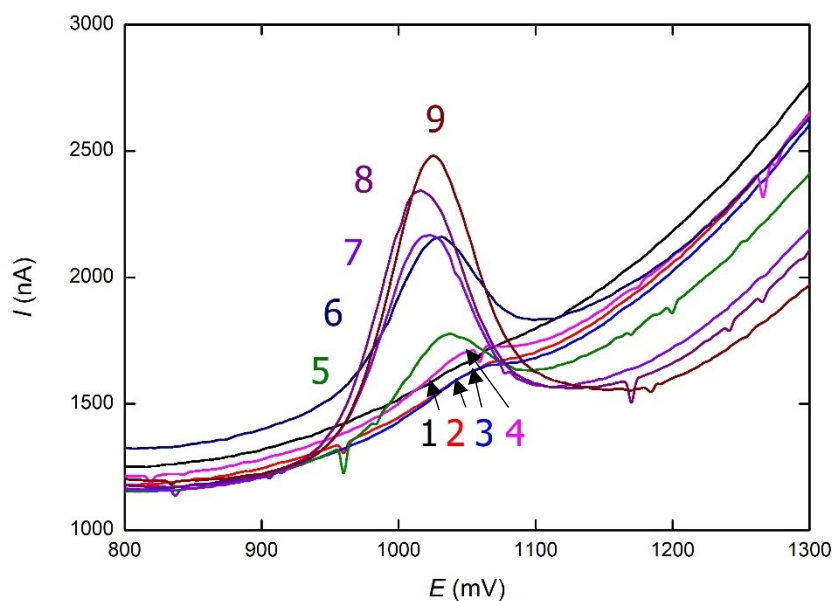
Obrázek 30: Kalibrační závislost pro NIM. Měřeno na UTGE pomocí DCV v prostředí BR pufru o pH 4,0 a ethanolu (7:3). V grafu zobrazena lineární regrese od 4 do 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$.



Obrázek 31: DC voltamogramy NIM při různých koncentracích. Měřeno na UTGE pomocí DCV v prostředí BR pufru o pH 4,0 a ethanolu (7:3). Koncentrace: 4 (1), 6 (2), 8 (3), 10 (4), 20 (5), 40 (6), 60 (7), 80 (8), 100 (9) $\mu\text{mol l}^{-1}$.



Obrázek 32: Kalibrační závislost pro NIM. Měřeno na UTGE pomocí DPV v prostředí BR pufru o pH 4,0 a ethanolu (7:3). V grafu zobrazena lineární regrese od 4 do 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$.



Obrázek 33: DP voltamogramy NIM při různých koncentracích. Měřeno na UTGE pomocí DPV v prostředí BR pufru o pH 4,0 a ethanolu. Koncentrace: 4 (1), 6 (2), 8 (3), 10 (4), 20 (5), 40 (6), 60 (7), 80 (8), 100 (9) $\mu\text{mol l}^{-1}$.

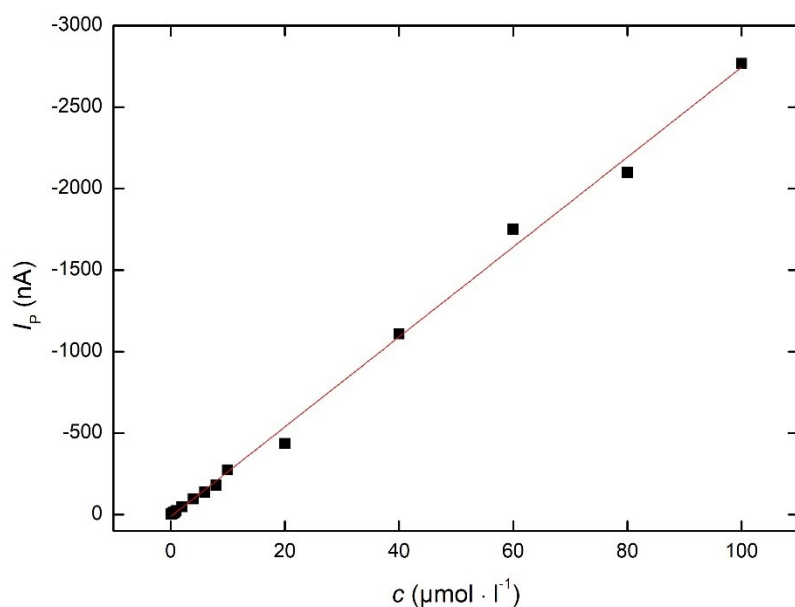
Tabulka 5: Parametry kalibračních přímek pro oxidační stanovení NIM, měřeno na UTGE v prostředí BR pufru o pH 4,0 a ethanolu (7:3).

Metoda	Směrnice ($\text{nA l } \mu\text{mol}^{-1}$)	Úsek (nA)	Korelační koeficient	LOD (mol l^{-1})
DCV	11,42	18,83	0,9997	$2,45 \cdot 10^{-6}$
DPV	12,00	0,40	0,9971	$7,79 \cdot 10^{-7}$

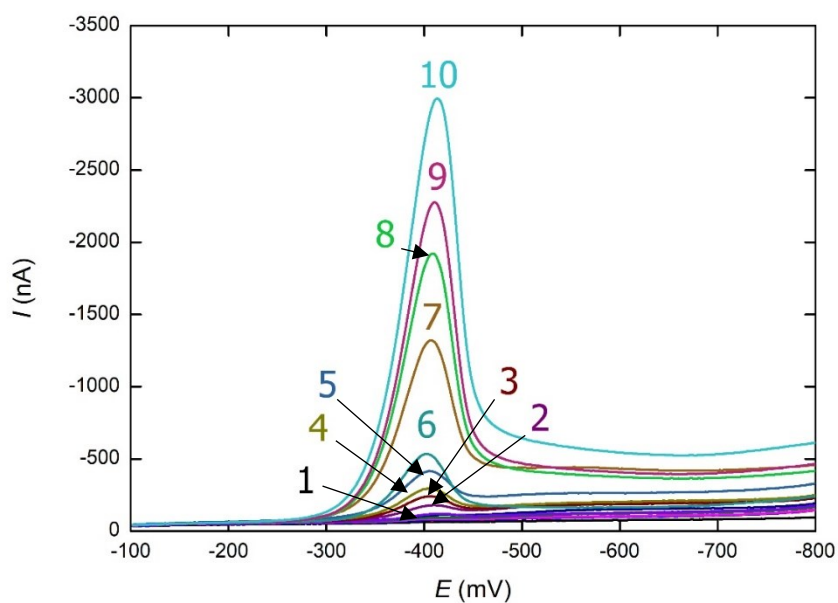
4.3.2 Redukční stanovení

Při redukčních stanoveních bylo zvoleno prostředí BR pufru o pH 2,0–ethanol (7:3) u obou metod a dále u DCV prostředí BR pufru o pH 4,0–ethanol (7:3) a u DPV prostředí BR pufru o pH 5,0–ethanol (7:3). Měření probíhalo dvěma způsoby, vzhledem k malým relativním odchylkám u obou metod, a to s oleštěním povrchu pracovní elektrody a bez oleštění. V prostředí BR pufru o pH 2,0–ethanol (7:3) byla měřena kalibrační závislost pouze bez oleštění elektrody. Bylo možné vyhodnotit všechny koncentrační řady, a proto se dá říct, že je redukční stanovení citlivější oproti oxidačnímu, čemuž nasvědčují i vyšší absolutní hodnoty získaných směrnic kalibračních přímek (tab. 6–8 vs. tab. 4 a 5). Obecně se elektroda

méně pasivuje a proudy píků jsou pro stejné koncentrace NIM je vyšší, a tudíž je lze snáze vyhodnotit. Na obr. 34 je zobrazena kalibrační závislost měřená metodou DCV v prostředí BR pufru o pH 2,0–ethanol (7:3), která je lineární v celé proměřované koncentrační škále. Obr. 35 ukazuje příslušné DC voltamogramy. Parametry lineární regrese jsou uvedeny v tab. 6.

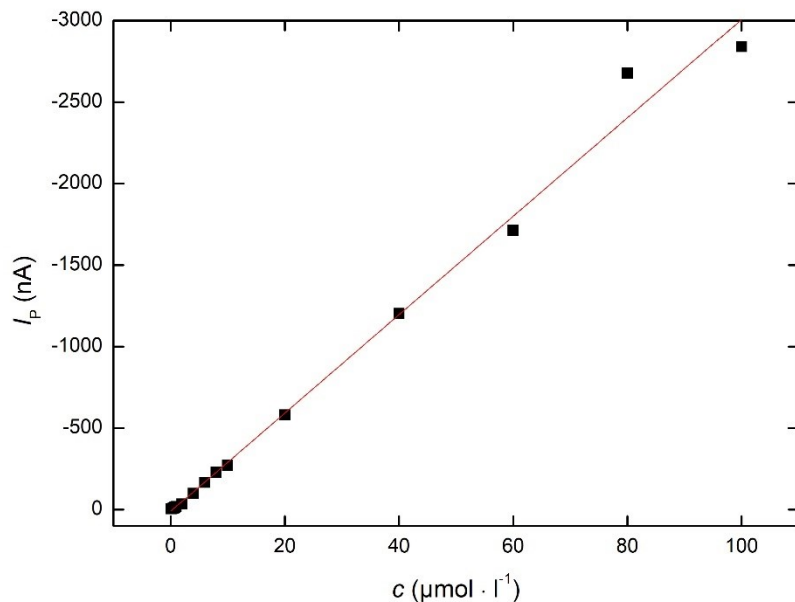


Obrázek 34: Kalibrační závislost pro NIM. Měřeno na UTGE pomocí DCV v prostředí BR pufru o pH 2,0 a ethanolu (7:3). V grafu zobrazena lineární regrese.

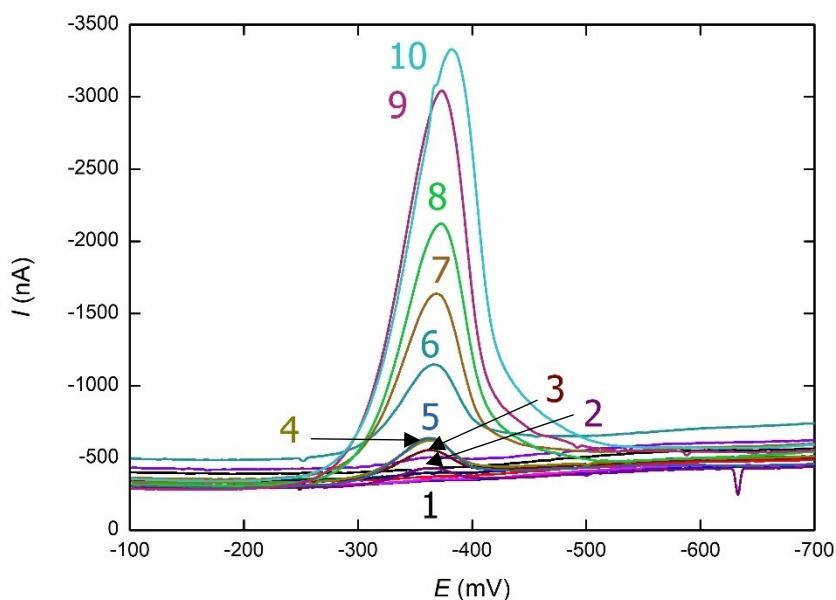


Obrázek 35: DC voltamogramy NIM při různých koncentracích. Měřeno na UTGE pomocí DCV v prostředí BR pufru o pH 2,0 a ethanolu (7:3). Koncentrace: 0,1 – 2 (1), 4 (2), 6 (3), 8 (4), 10 (5), 20 (6), 40 (7), 60 (8), 80 (9), 100 (10) $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Na obr. 36 je zobrazena kalibrační závislost měřená metodou DPV v prostředí BR pufru o pH 2,0–ethanol (7:3). Obr. 37 ukazuje příslušné DP voltamogramy. Parametry lineární regrese jsou uvedeny v tab. 6.



Obrázek 36: Kalibrační závislost pro NIM. Měřeno na UTGE pomocí DPV v prostředí BR pufru o pH 2,0 a ethanolu (7:3). V grafu zobrazena lineární regrese.

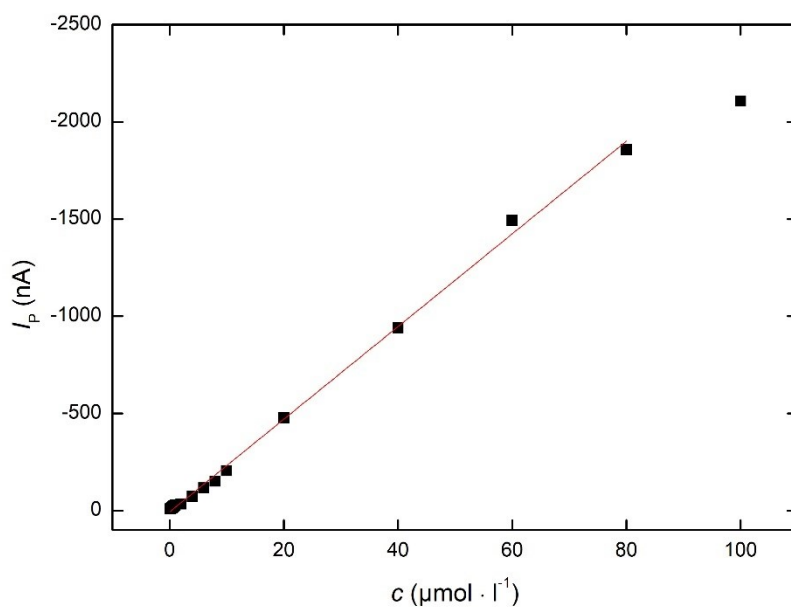


Obrázek 37: DP voltamogramy NIM při různých koncentracích. Měřeno na UTGE pomocí DPV v prostředí BR pufru o pH 2,0 a ethanolu (7:3). Koncentrace: 0,1 – 2 (1), 4 (2), 6 (3), 8 (4), 10 (5), 20 (6), 40 (7), 60 (8), 80 (9), 100 (10) $\mu\text{mol} \text{ l}^{-1}$.

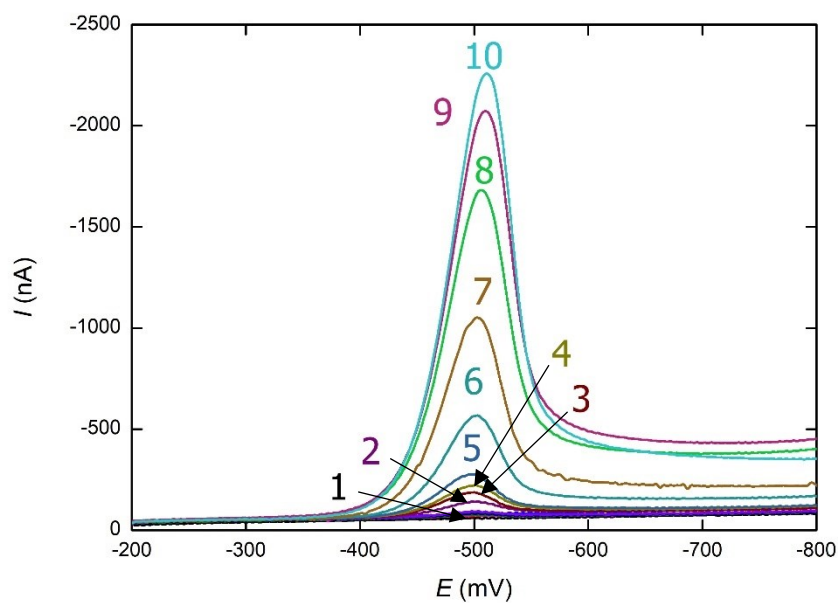
Tabulka 6: Parametry kalibračních přímk pro redukční stanovení NIM, měřeno na UTGE v prostředí BR pufru o pH 2,0 a ethanolu (7:3).

Metoda	Směrnice (nA l μmol^{-1})	Úsek (nA)	Korelační koeficient	LOD (mol l $^{-1}$)
DCV	-27,57	12,73	-0,9985	$2,08 \cdot 10^{-7}$
DPV	-30,17	10,24	-0,9960	$1,79 \cdot 10^{-7}$

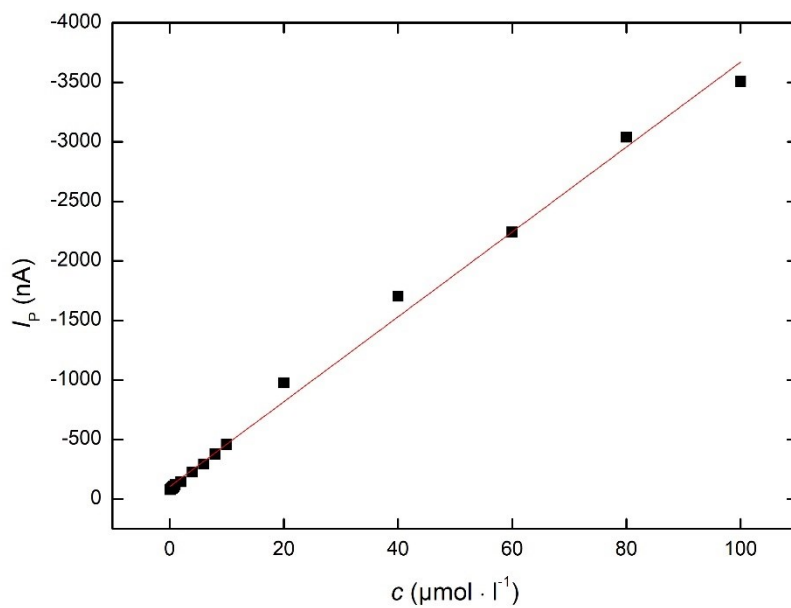
Na obr. 38 (bez oleštění povrchu pracovní elektrody) a 40 (s oleštěním elektrody) je zobrazena kalibrační závislost měřená metodou DCV v prostředí BR pufru o pH 4,0–ethanol (7:3). Obr. 39 (bez oleštění povrchu pracovní elektrody) a 41 (s oleštěním elektrody) ukazuje příslušné DC voltamogramy. Parametry lineárních regresí jsou uvedeny v tab. 7.



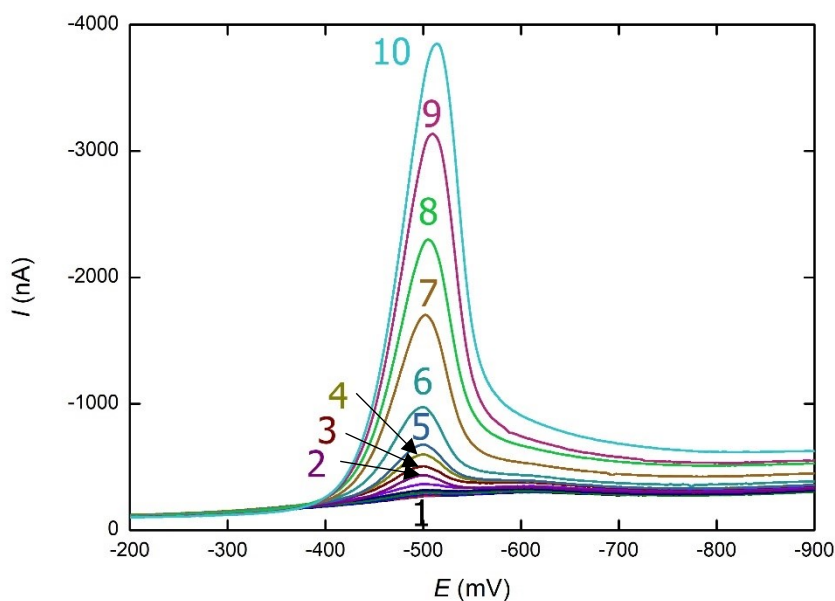
Obrázek 38: Kalibrační závislost pro NIM. Měřeno na UTGE pomocí DCV v prostředí BR pufru o pH 4,0 a ethanolu (7:3). V grafu zobrazena lineární regrese od 0,1 do 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$.



Obrázek 39: DC voltamogramy NIM při různých koncentracích. Měřeno na UTGE pomocí DCV v prostředí BR pufru o pH 4,0 a ethanolu (7:3). Koncentrace: 0,1 – 2 (1), 4 (2), 6 (3), 8 (4), 10 (5), 20 (6), 40 (7), 60 (8), 80 (9), 100 (10) $\mu\text{mol l}^{-1}$.



Obrázek 40: Kalibrační závislost pro NIM. Měřeno na UTGE pomocí DCV v prostředí BR pufru o pH 4,0 a ethanolu (7:3). V grafu zobrazena lineární regrese.

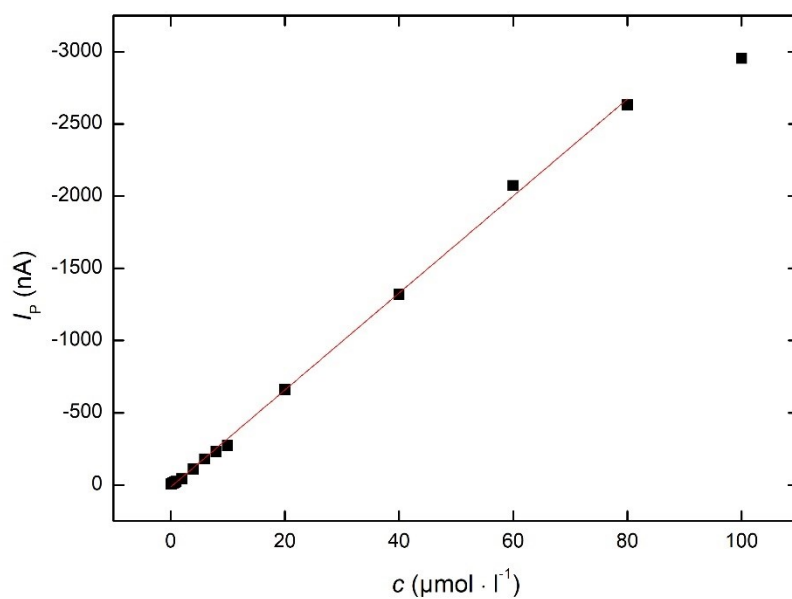


Obrázek 41: DC voltamogramy NIM při různých koncentracích. Měřeno na UTGE pomocí DCV v prostředí BR pufru o pH 4,0 a ethanolu (7:3). Koncentrace: 0,1 – 2 (1), 4 (2), 6 (3), 8 (4), 10 (5), 20 (6), 40 (7), 60 (8), 80 (9), 100 (10) $\mu\text{mol l}^{-1}$.

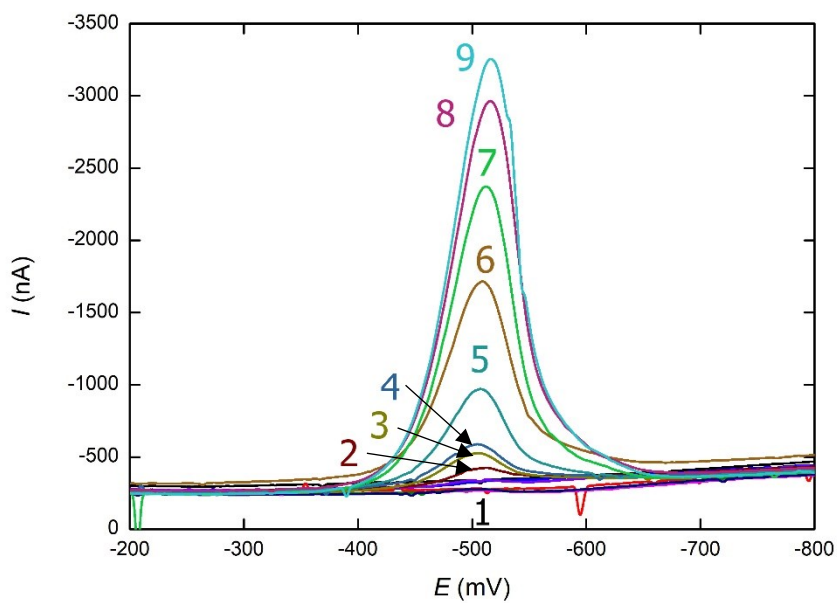
Tabulka 7: Parametry kalibračních přímek pro redukční stanovení NIM, měřeno na UTGE pomocí DCV v prostředí BR pufru o pH 4,0 a ethanolu (7:3).

Úprava UTGE	Směrnice ($\text{nA l } \mu\text{mol}^{-1}$)	Úsek (nA)	Korelační koeficient	LOD (mol l^{-1})
Bez oleštění	-23,84	6,945	-0,9990	$1,95 \cdot 10^{-7}$
S oleštěním	-35,65	-104,5	-0,9976	$1,00 \cdot 10^{-6}$

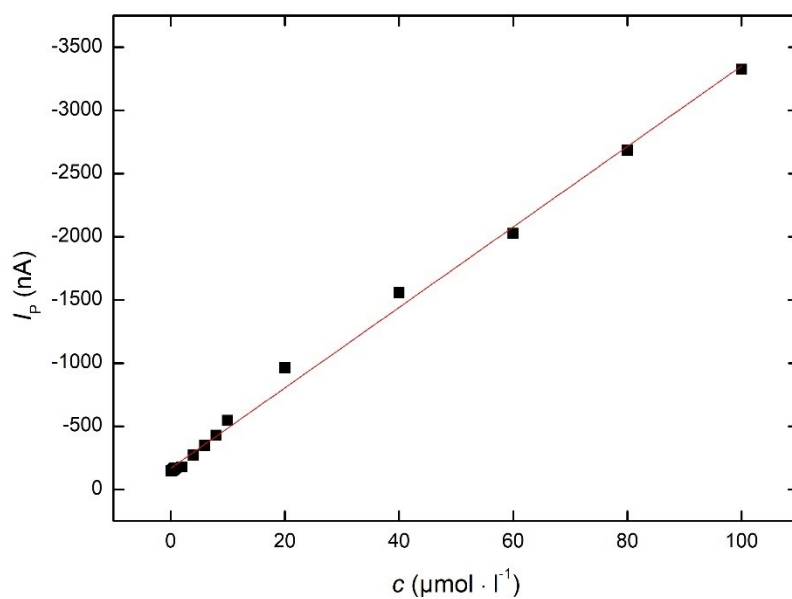
Na obr. 42 (bez oleštění povrchu pracovní elektrody) a 44 (s oleštěním elektrody) je zobrazena kalibrační závislost měřená metodou DPV v prostředí o BR pufru o pH 5,0–ethanol (7:3). Obr. 43 (bez oleštění povrchu pracovní elektrody) a 45 (s oleštěním elektrody) ukazuje příslušné DP voltamogramy. Parametry lineárních regresí jsou uvedeny v tab. 8.



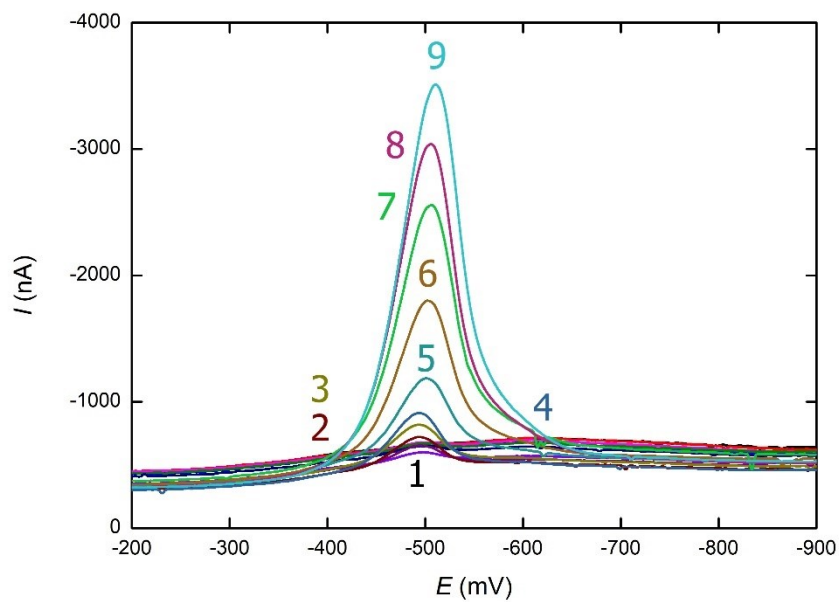
Obrázek 42: Kalibrační závislost pro NIM. Měřeno na UTGE pomocí DPV v prostředí BR pufru o pH 5,0 a ethanolu (7:3). V grafu zobrazena lineární regrese.



Obrázek 43: DP voltamogramy NIM při různých koncentracích. Měřeno na UTGE pomocí DPV v prostředí BR pufru o pH 5,0 a ethanolu (7:3). Koncentrace: 0,1 – 4 (1), 6 (2), 8 (3), 10 (4), 20 (5), 40 (6), 60 (7), 80 (8), 100 (9) $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$.



Obrázek 44: Kalibrační závislost pro NIM. Měřeno na UTGE pomocí DPV v prostředí BR pufru o pH 5,0 a ethanolu (7:3). V grafu zobrazena lineární regrese.



Obrázek 45: DP voltamogramy NIM při různých koncentracích. Měřeno na UTGE pomocí DPV v prostředí BR pufru o pH 5,0 a ethanolu (7:3). Koncentrace: 0,1 – 4 (1), 6 (2), 8 (3), 10 (4), 20 (5), 40 (6), 60 (7), 80 (8), 100 (9) $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Tabulka 8: Parametry kalibračních přímek pro redukční stanovení NIM, měřeno na UTGE pomocí DPV v prostředí BR pufru o pH 5,0 a ethanolu (7:3).

Úprava UTGE	Směrnice (nA l μmol^{-1})	Úsek (nA)	Korelační koeficient	LOD (mol l $^{-1}$)
Bez oleštění	-33,59	15,05	-0,9994	$4,17 \cdot 10^{-7}$
S oleštěním	-31,85	-166,1	-0,9983	$1,17 \cdot 10^{-6}$

5. Závěr

Tato diplomová práce se zabývala studiem elektrochemického chování nesteroidního protizánětlivého léku nimesulid (NIM). Byla vypracována metoda pro stanovení nimesulidu pomocí dvou technik – DC voltametrie (DCV) a diferenční pulzní voltametrie (DPV). Jako pracovní elektroda byla použita kompozitní uhlíková elektroda z ultračistého grafitu (UTGE). Studováno bylo oxidační i redukční chování NIM a byl zkoumán mechanismus elektrodové reakce, kde bylo určeno že se na oxidaci i redukcii podílí stejný počet H^+ iontů a elektronů. Při zásaditých pH probíhá katodická reakce pravděpodobně ve dvou krocích přes vznik nitreradikálového aniontu, protože hodnota proudu píku prudce klesá a reakce je tudíž pomalejší.

Byly nalezeny optimální podmínky pro stanovení NIM pro obě voltametrické metody. Bylo zjištěno, že katodické redukční stanovení má vyšší citlivost než anodické oxidační, ale i v oxidační části potenciálů lze nalézt optimální podmínky pro stanovení NIM. Pro anodickou DCV je to směsné prostředí BR pufru o pH 4,0 a ethanolu (7:3), kde bylo možné získat lineární závislost v koncentračním rozmezí od 4 do 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Pro anodickou DPV je to směsné prostředí BR pufru o pH 2,0 a ethanolu (7:3), kde byl proměřen lineární koncentrační rozsah od 1 do 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Obě metody vyžadovaly krátké oleštění povrchu pracovní elektrody před každým měřením, což vedlo ke získání vyšších proudů píků.

Pro katodické redukce můžeme volit varianty s oleštěním i bez oleštění povrchu pracovní elektrody – bez oleštění měly kalibrace vždy vyšší korelační koeficient a v prostředích BR pufru o pH 4,0 (DCV) i pH 5,0 (DPV) a ethanolu (7:3) byla získaná kalibrační závislost lineární pouze do 80 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Zde za ideální prostředí můžeme považovat všechna proměřená prostředí, avšak z hlediska rychlosti a praktičnosti by byla vhodnější měření bez oleštění povrchu UTGE, pokud by se nejednalo o koncentrace NIM vyšší než 80 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Pokud by se jednalo o stanovení vyšších koncentrací NIM, pak by byla vhodnější metoda s oleštěním povrchu pracovní elektrody. U všech vyvinutých metod byly určeny hodnoty LOD a LOQ (výsledky v tab. 9), které je možné snadno porovnat s alternativními voltametrickými metodami stanovení NIM (tab. 10).

Dalším krokem pro pokračující výzkum tohoto tématu by bylo stanovení NIM výše vyvinutými metodami v lékových formách, případně aplikace na vzorky pitné a říční vody.

Tabulka 9: Přehled dosažených mezí detekce (LOD) a stanovitelnosti (LOQ) při stanovení NIM pomocí DCV a DPV na UTGE. Hodnota pH udává pH použitého BR pufru ve využívaných základních elektrolytech o složení BR pufr–ethanol (7:3). Techniky s hvězdičkou jsou provedeny s oleštěním elektrody před každým měřením.

pH	Technika	LOD (mol l ⁻¹)	LOQ (mol l ⁻¹)
2,0	DCV – oxidace*	$7,18 \cdot 10^{-7}$	$2,39 \cdot 10^{-6}$
	DPV – oxidace*	$3,79 \cdot 10^{-7}$	$1,26 \cdot 10^{-6}$
4,0	DCV – oxidace*	$2,45 \cdot 10^{-6}$	$1,38 \cdot 10^{-5}$
	DPV – oxidace*	$7,79 \cdot 10^{-7}$	$2,60 \cdot 10^{-6}$
2,0	DCV – redukce	$2,08 \cdot 10^{-7}$	$6,93 \cdot 10^{-7}$
	DPV – redukce	$1,79 \cdot 10^{-7}$	$5,97 \cdot 10^{-7}$
4,0	DCV – redukce	$1,95 \cdot 10^{-7}$	$6,51 \cdot 10^{-7}$
	DCV – redukce*	$1,00 \cdot 10^{-6}$	$3,33 \cdot 10^{-6}$
5,0	DPV – redukce	$4,17 \cdot 10^{-7}$	$1,39 \cdot 10^{-6}$
	DPV – redukce*	$1,17 \cdot 10^{-6}$	$3,89 \cdot 10^{-6}$

Tabulka 10: Porovnání hodnot mezí detekce (LOD) dosažených pro stanovení NIM pomocí DCV a DPV na UTGE a mezí detekce alternativních elektrochemických metod.

Technika	Elektroda	LOD (mol l ⁻¹)	Literatura
DPV	GCE (nemodifikovaná)	$3,2 \cdot 10^{-6}$	16
DPV	HMDE	$5,0 \cdot 10^{-6}$	20
DPV	GCE/nanočástice TiO ₂	$3,4 \cdot 10^{-9}$	22
DPV	CPE/uhlíkové nanotrubic	$1,1 \cdot 10^{-9}$	13
SWV	CPE/pryskyřice Amberlite XAD-4	$1,3 \cdot 10^{-8}$	32
CV	Sítotisková uhlíková elektroda/oxid grafenu	$3,5 \cdot 10^{-9}$	37
SWV	Zlatá elektroda/L-cystein	$4,5 \cdot 10^{-7}$	38
DCV	UTGE	$2,0 \cdot 10^{-7}$	tato práce
DPV	UTGE	$1,8 \cdot 10^{-7}$	tato práce

6. Literatura

1. A. K. Singla, M. Chawla, A. Singh, **Review Nimesulide: Some Pharmaceutical and Pharmacological Aspects – An Update**, *J. Pharm. Pharmacol.*, 2000, 52, 467–486.
2. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/nimesulid-a-zruseni-indikace-pro-symptomatickou-lecbu>, staženo 10.9.2021.
3. Dostupné z: <http://www.pharmaceutical-drug-manufacturers.com/pharmaceutical-drugs/nimesulide.html>, staženo 17.9.2021.
4. P. Gupta, H. P. Sachdev, **Safety of Oral Use of Nimesulide in Children: Systematic Review of Randomized Controlled Trials**, *Indian Pediatr.*, 2003, 40 (6), 518–531.
5. S. Furlanetto, **Designing Experiments to Optimise and Validate the Adsorptive Stripping Voltammetric Determination Of Nimesulide**, *Anal. Chim. Acta*, 2000, 413 (1–2), 229–239.
6. Dostupné z: <https://web.archive.org/web/20171223043951/https://livertox.nih.gov/Nimesulide.htm>, staženo 1.10.2021.
7. K. C. De Siqueira Leite, L. F. Garcia, G. Sanz, F. Colmati, A. R. De Souza, D. Da Costa Batista, R. Menegatti, E. De Souza Gil, R. Luque, **Electrochemical Characterization of a Novel Nimesulide Anti-Inflammatory Drug Analog: Lqfm-091**, *J. Electroanal. Chem.*, 2018, 818 (1), 92–96.
8. J. H. Lewis, J. G. Stine, **Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Leukotriene Receptor Antagonists**, v knize: **Drug-Induced Liver Disease (Third Edition)** (N. Kaplowitz, L. DeLeve, ed.), Academic Press, Cambridge 2013, 369–401.
9. P. A. McCormick, F. Kennedy, M. Curry, O. Traynor, **Cox 2 Inhibitor and Fulminant Hepatic Failure**, *Lancet*, 1999, 353 (9146), 40–41.
10. G. P. Andreu, E. T. S. Yamamoto, C. Curti, Z. Naal, **The Redox Process of Nimesulide and Its Metabolite in Nad(P)H Oxidation**, *Afinidad*, 2004, 61 (514), 496–499.
11. R. Moscoso, A. Álvarez-Lueje, J.A. Squella, **Nanostructured Interfaces Containing MWCNT and Nitro Aromatics: A New Tool to Determine Nimesulide**, *Microchem. J.*, 2020, 159, 105361.

12. A. Alvarez-Lueje, P. Va'squez, L.J. Nuaez-Vergara, J.A. Squella, **Voltammetric Study of Nimesulide and Its Differential Pulse Polarographic Determination in Pharmaceuticals**, *Electroanalysis*, 1997, 9 (15), 1209–1213.
13. F. Ađın, V. Serdarođlu, **Voltammetric Determination of Nimesulide Using Multiwalled Carbon Nanotubes Modified Carbon Paste Electrode**, *Turk. J. Pharm. Sci.*, 2016, 13 (3), 335–341.
14. Dostupné z: http://www.lekopolis.cz/Kap_6_1_Nimesulidum.htm, staženo 4.9.2021.
15. M. Starek, J. Krzek, **A Review of Analytical Techniques for Determination of Oxicams, Nimesulide and Nabumetone**, *Talanta*, 2009, 77 (3), 925–942.
16. I. Santos Da Silva, B. Capovilla, K. H. Garcia Freitasc, L. Angnes, **Strategies to Avoid Electrode Fouling for Nimesulide Detection Using Unmodified Electrodes**, *Anal. Methods*, 2013, 14 (5), 3546–3551.
17. P. F. Pereira, M. C. Marra, A. B. Lima, W. T. Pio Dos Santos, R. A. A. Munoz, E. M. Richter, **Fast and Simultaneous Determination of Nimesulide and Paracetamol by Batch Injection Analysis with Amperometric Detection on Bare Boron-Doped Diamond Electrode**, *Diam. Relat. Mater.*, 2013, 39, 41–46.
18. F. W. P. Ribeiro, T. R. V. Soares, S. Oliveira, L. C. Melo, J. E. Soares, H. Becker, D. De Souza, P. De Lima-Neto, A. N. Correia, **Analytical Determination of Nimesulide and Ofloxacin in Pharmaceutical Preparations Using Square-Wave Voltammetry**, *J. Anal. Chem.*, 2014, 69 (1), 62–71.
19. L. Miranda, V. C. Pereira, C. S. Machado, **Direct Determination of Nimesulide in Natural Waters and Wastewater By Cathodic Stripping Voltammetry**, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 2017, 73, 631–640.
20. L. M. Kashid, S. V. Patil, G. B. Kolekar, B. V. Tamhankar, **Optimisation of Instrumental Conditions and Parameters by Differential Pulse Polarography for Determination of Riboflavin and Nimesulide from Pharmaceutical Samples**, *Research J. Pharm. Tech.*, 2020, 13 (11), 5121–5126.
21. C. Wang, X. Shao, Q. Liu, Q. Qu, G. Yang, X. Hu, **Differential Pulse Voltammetric Determination of Nimesulide in Pharmaceutical Formulation and Human Serum at Glassy Carbon Electrode Modified by Cysteic Acid/CNTs Based on Electrochemical Oxidation of L-Cysteine**, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2006, 42 (2), 237–244.

22. S. D. Bukkitgar, N. P. Shetti, R. M. Kulkarni, S. B. Halbhavi, M. Wasim, M. Mylar, P. S. Durgi, S. S. Chirmure, **Electrochemical Oxidation of Nimesulide in Aqueous Acid Solutions Based on TiO₂ Nanostructure Modified Electrode as a Sensor**, *J. Electroanal. Chem.*, 2016, 778, 103–109.
23. P. B. Deroco, R. C. Rocha-Filho, O. Fatibello-Filho, **A New and Simple Method for the Simultaneous Determination of Amoxicillin and Nimesulide Using Carbon Black Within a Dihexadecylphosphate Film as Electrochemical Sensor**, *Talanta*, 2018, 179, 115–123.
24. A. Wong, A. M. Santos, O. Fatibello-Filho, **Determination of Piroxicam and Nimesulide Using an Electrochemical Sensor Based on Reduced Graphene Oxide and PEDOT:PSS**, *J. Electroanal. Chem.*, 2017, 799, 547–555.
25. S. D. Bukkitgar, N. P. Shetti, R. M. Kulkarni, M. R. Doddamani, **Electro-Oxidation of Nimesulide at 5% Barium-Doped Zinc Oxide Nanoparticle Modified Glassy Carbon Electrode**, *J. Electroanal. Chem.*, 2016, 762, 37–42.
26. R. Ghavami, A. Navaee, **Determination of Nimesulide in Human Serum Using a Glassy Carbon Electrode Modified with SiC Nanoparticles**, *Microchim. Acta*, 2012, 176, 493–499.
27. G. O. El-Sayed, S. A. Yasin, M. A. El Ries, A. A. El-Badawy, **Adsorptive Voltammetric Determination of Nimesulide at Glassy Carbon Electrode**, *Lat. Am. J. Pharm.*, 2009, 28 (5), 741–746.
28. M. Łysoń, A. Górska, B. Paczosa-Bator, **Nimesulide Determination on Carbon Black-Nafion Modified Glassy Carbon Electrode by Means of Adsorptive Stripping Voltammetry**, *Electrocatalysis*, 2021, 12, 641–649.
29. J. Anupriya, S. M. Babulal, T-W. Chen, S-M. Chen, J. V. Kumar, J.-W. Lee, S.-P. Rwei, J. Yu, R. Yu, C.-Y. Hong, **Facile Hydrothermal Synthesis of Cubic Zinc Ferrite Nanoparticles for Electrochemical Detection of Antiinflammatory Drug Nimesulide in Biological and Pharmaceutical Sample**, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2021, 16, 210772.
30. R. I. L. Catarino, A. C. L. Conceição, M. B. Q. Garcia, M. L. S. Gonçalves, J. L. F. C. Lima, M. M. Correia Dos Santos, **Flow Amperometric Determination of Pharmaceuticals with On-Line Electrode Surface Renewal**, *J. Pharm. Biomed.*, 2003, 33 (4), 571–580.

31. N. P. Shetti, S. J. Malode, S. D. Bukkitgar, G. B. Bagihalli, R. M. Kulkarni, S. B. Pujari, K. R. Reddy, **Electro-Oxidation and Determination of Nimesulide at Nanosilica Modified Sensor**, *Mater. Sci. Technol.*, 2019, 2 (3), 396–400.
32. N. P. Shetti, M. M. Shanbhag, S. J. Malode, R. K. Srivastava, K. R. Reddy, **Amberlite XAD-4 Modified Electrodes for Highly Sensitive Electrochemical Determination of Nimesulide in Human Urine**, *Microchem. J.*, 2020, 153, 104389.
33. N. P. Shetti, S. J. Malode, D. S. Nayak, S. D. Bukkitgar, G. B. Bagihalli, R. M. Kulkarni, K. R. Reddy, **Novel Nanoclay-Based Electrochemical Sensor for Highly Efficient Electrochemical Sensing Nimesulide**, *J. Phys. Chem. Solids*, 2020, 137, 109210.
34. U. S. Devarushi, N. P. Shetti, S. J. Malode, S. M. Tuwar, **Electro Oxidation and Analytical Applications of Nimesulide at Graphene Oxide and Reduced Graphene Oxide Modified Carbon Paste Electrode**, *Mater. Today: Proc.*, 2019, 18 (3), 751–758.
35. K. Prabhu, S. J. Malode, R. S. Veerapur, N. P. Shetti, **Clay-Based Carbon Sensor for Electro-Oxidation of Nimesulide**, *Mat. Chem. Phys.*, 2021, 272, 124992.
36. A. Wong, A. M. Santos, M. Baccarin, É. T. G. Cavalheiro, O. Fatibello-Filho, **Simultaneous Determination of Environmental Contaminants Using a Graphite Oxide – Polyurethane Composite Electrode Modified with Cyclodextrin**, *Mater. Sci. Eng. C.*, 2019, 99, 1415–1423.
37. M. Govindasamy, V. Mani, S-M. Chen, T. Maiyalagan, S. Selvaraj, T-W. Chen, S-Y. Lee, W-H. Chang, **Highly Sensitive Determination of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Nimesulide Using Electrochemically Reduced Graphene Oxide Nanoribbons**, *RSC Adv.*, 2017, 52 (7), 33043-33051.
38. S. Menon, K. G. Kumar, **Simultaneous Voltammetric Determination of Acetaminophen and Its Fatal Counterpart Nimesulide by Gold Nano/L-Cysteine Modified Gold Electrode**, *J. Electrochem. Soc.*, 2017, 164, 9.
39. S. J. Malode, **Electro-Oxidation of Nimesulide at Gold Electrode and Its Determination in Pharmaceutical Dosage Form and Human Biological Fluid**, *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, 2013, 6 (3), 71–76.
40. A. F. Alghamdi, **High Sensitivity Determination of Atorvastatin Calcium in Pharmaceuticals and Biological Fluids Using Adsorptive Anodic Stripping**

- Voltammetry onto Surface of Ultra-Trace Graphite Electrode**, *Curr. Anal. Chem.*, 2018, 14 (2), 92–100.
41. Sadikoglu M., Saglikoglu G., Yagmur S., Orta E., Yilmaz S.: **Voltammetric Determination of Acyclovir in Human Urine Using Ultra Trace Graphite and Glassy Carbon Electrodes**, *Curr. Anal. Chem.*, 2011, 7 (2), 130–135.
42. S. J. Malode, S. T. Nandibewoor, **Electrochemical Oxidation and Determination of Nimesulide Using a Carbon Paste Electrode**, *Z. Phys. Chem.*, 2013, 227, 73–87.